



# **A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento**

**Maria José Abrantes dos Santos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Vegetais**

Orientador: Professor Doutor José Manuel do Nascimento Baptista de Gouveia

## **Júri**

Presidente: Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora  
Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor José Manuel do Nascimento Baptista de Gouveia, Professor Auxiliar  
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;  
António Pedro Louro Martins, Professor Convidado do Instituto Superior de  
Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2009

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Doutor Professor Doutor José Manuel do Nascimento Baptista de Gouveia por toda a ajuda, apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Suzana Ferreira Dias, pela amizade e ajuda no tratamento de dados.

À Engenheira Paula Vasconcelos por toda a ajuda, disponibilidade e paciência durante a realização prática deste trabalho no LET.

Às Engenheiras Helena Alegre e Ana Carrilho, e às técnicas de laboratório Andreia Faria, Marlene Dionísio, Maria de Lurdes Salgueira Alves e Ofélia Gonçalves por todo o auxílio prestado durante a execução das análises laboratoriais.

Ao Engenheiro Paulo Santos da AirLiquide pela ajuda e deslocações constantes.

Ao Engenheiro Henrique da Cromolab, por todo o apoio técnico prestado.

Ao meu Pai e Irmão por todo o carinho e por acreditar em mim.

À Tunassa, a minha segunda família no ISA.

À Cardcrew, à Andreia e à Inês pela amizade ao longo de todos estes anos.

À minha direcção da AEISA, pela compreensão e apoio durante a realização da dissertação.

## RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a evolução de azeite armazenado em depósitos de ácido inox, ao longo de seis meses. Para tal, optou-se por uma variedade espanhola de azeitona, arbequina, cuja estabilidade oxidativa é menor, relativamente a outros azeites monovarietais. Dado que o azeite é susceptível de oxidar-se na presença de oxigénio, montou-se dois tipos de ensaios: um em que o azeite esteve em 3 depósitos cuja atmosfera não foi alterada (atmosfera normal) e outro em que o azeite esteve em 3 depósitos nos quais o espaço de cabeça foi preenchido com gás inerte (azoto). Mensalmente, colheu-se amostras dos diversos depósitos e analisou-se relativamente a: acidez, índice de peróxidos, índice espectrofotométrico, tocoferóis, polifenóis totais, estabilidade oxidativa, triacilgliceróis oxidados e análise sensorial. Com os resultados obtidos para o período em estudo, pôde-se verificar que as diferenças relativamente aos parâmetros químicos não são muito significativas, embora o azeite que se encontrava nos depósitos com atmosfera normal tenha apresentado valores de oxidação dos glicéridos ligeiramente superiores aos do azeite armazenado sob atmosfera inerte. Relativamente à análise sensorial, os depósitos com atmosfera inerte apresentaram uma melhor classificação. Os atributos “frutado”, “picante” e “doce” revelaram uma diferença significativa mais intensa para os depósitos com azoto.

**Palavras-chave:** azeite, arbequina, azoto, depósitos de armazenamento, oxidação

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the stability of olive oil during six months of storage in stainless steel tanks (similar to those used in the mills). For this, six oil mill tanks were used, three with a normal atmosphere and three more with a modified atmosphere, with nitrogen, since the olive oil easily reacts with oxygen and suffers oxidative deterioration. The purpose was to determinate if olive oil stored in tanks with a non reactive atmosphere maintains its initial characteristics for a longer period of time. A Spanish variety was selected, Arbequina, that presents lower oxidation stability, relative to other olive oil varieties. Every month, different chemical analyses were performed: acidity, peroxide, index, spectrophotometry, tocopherols, polyphenols, oxidative stability and triacylglycerols oxidation. The olive oil stored with a normal atmosphere showed a slightly higher oxidative deterioration when compared with the olive oil stored in the tanks with a modified atmosphere, but no significant differences were found between the two different kinds of atmospheres except in triacylglycerols oxidation. In the sensorial analysis the oil mill tanks with a non reactive atmosphere presented a greater intensity in the “fruity”, “spicy” and “sweet” attributes, and also had a better final classification

**Key-words:** olive oil, arbequina, nitrogen, storage tanks, oxidative deterioration

## EXTENDED ABSTRACT

Virgin olive oils are the oils obtained from the fruit of the olive tree solely by mechanical or other physical means under conditions, particularly thermal conditions, that do not lead to alterations in the oil, and which have not undergone any treatment other than washing, decantation, centrifugation and filtration. The olive oil is the principal source of fat in the Mediterranean diet. Its composition is rich in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, has vitamins (A, D, E and K) and natural antioxidants.

The olive oil autoxidation has been recognized as the predominant cause of oil deterioration during storage. This is a reaction between unsaturated fatty acids, regardless of whether they are in their free state or esterified as a triglyceride molecule, and oxygen. Therefore, autoxidation in oils can neither be prevented by maintaining cool storage conditions nor by the exclusion of light.

Consumers are increasingly demanding that high food quality be maintained during the period between purchase and consumption. These expectations are a consequence not only of the primary requirement that the food should remain safe but also of the need to minimize unwanted changes in sensory quality.

The aim of this work was to evaluate the stability of olive oil during six months of storage in stainless steel tanks (similar to those used in the mills). For this, six oil mill tanks were used, three with a normal atmosphere and three more with a modified atmosphere, with nitrogen, since the olive oil easily reacts with oxygen and suffers oxidative deterioration. The purpose was to determinate if olive oil stored in tanks with a non reactive atmosphere maintains its initial characteristics for a longer period of time. For this, a Spanish variety was selected, Arbequina, that presents a lower oxidation stability, relative to other olive oil varieties. The Arbequina olive comes from Northern Spain, from a region known as Catalonia. The fruit is small in size compared to alternative varieties, but will produce an excellent tasting oil without blending with others. Also, it will provide one of the highest quantities of oil per fruit.

Every month, different chemical analyses of the olive oil stored in the oil mill tanks were performed: acidity, peroxide, index, spectrophotometry, tocopherols, polyphenols, oxidative stability and triacylglycerols oxidation. Tocopherols and polyphenols were determined because they are antioxidant compounds that protect the olive oil against

the oxidation process. The other analyses were utilized to determine the degree of the olive oil oxidation. The olive oil quality control is verified by the acidity (% of free fat acids, expressed as oleic acid), peroxide index (verifies the initial oxidation of the olive oil), spectrophotometry (specific extinction coefficient determination,  $K_{232}$  and  $K_{270}$ ). The oxidative stability is measured by Rancimat (determinates the resistance to oxidative deterioration). The triacylglycerols oxidation is defined as a percentage.

The sensorial analysis was determined to compare the evolution of the olive oil in the different tanks. The aim was to determine if an alteration in the atmosphere was conducive to an alteration in the organoleptic characteristics.

The tanks with a non reactive atmosphere were checked every month to guarantee that there was no presence of oxygen inside them. Also conducted was a sensorial analysis to compare the intensity of the different attributes of the olive oil from the different reservoirs.

The olive oil stored with a normal atmosphere showed a slightly higher oxidative deterioration when compared with the olive oil stored in the tanks with a modified atmosphere, but no significant differences were found between the two different kinds of atmospheres. In the sensorial analysis the oil mill tanks with a non reactive atmosphere presented a greater intensity in the “fruity”, “spicy” and “sweet” attributes. It also had a better final classification in comparison with the reservoir with normal atmosphere. The study period was short, but the results indicate, in the point of view of the olive oil quality, that there are vantages in the utilization of inert gas in the olive oil storage tanks.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
EXTENDED ABSTRACT .....	iv
ÍNDICE GERAL .....	vi
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O AZEITE .....	4
2.1.1. Composição química do azeite .....	8
2.1.2. Reacções de degradação do azeite .....	13
2.1.3. Armazenamento do azeite .....	18
2.1.3.1. Aplicação de gás inerte em depósitos de azeite .....	19
2.2. VARIEDADE ARBEQUINA.....	21
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	23
3.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1.1. Controlo laboratorial químico .....	25
3.1.1.1. Acidez .....	25
3.1.1.2. Índice de peróxidos .....	25

3.1.1.3. Índice espectrofotométrico.....	27
3.1.1.4. Estabilidade oxidativa.....	28
3.1.1.5 Polifenóis totais .....	30
3.1.1.6 Tocoferóis.....	31
3.1.1.7 Triacilgliceróis oxidados.....	33
3.1.2. Controlo laboratorial sensorial.....	36
3.1.3. Análise estatística de resultados.....	37
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	 38
4.1. Controlo laboratorial químico.....	38
4.2. Controlo laboratorial sensorial.....	46
 5. CONCLUSÕES.....	 49
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 50
 CIBERGRAFIA .....	 53
 ANEXOS.....	 53



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características conformes para cada categoria de azeite. ....	5
Quadro 2 - Composição dos ácidos gordos presentes no azeite.....	9
Quadro 3 - Graus de oxidação detectados em azeites.....	34
Quadro 4 – Caracterização do azeite utilizado, antes de ser colocado em depósitos. ....	38
Quadro 5 – Ácidos gordos do azeite de variedade arbequina utilizado no ensaio.....	38
Quadro 6 – Valor dos esteróis, eristrodio + uvaol e ceras do azeite arbequina .....	39
Quadro 7 – Triacilgliceróis oxidados avaliados pelo Teste de Scheffe. ....	45
Quadro 8 – Média dos valores obtidos através de análise sensorial das amostras.....	46
Quadro 9 – Avaliação do atributo “frutado” através do teste LSD.....	46
Quadro 10 - Avaliação do aroma “frutado” através do teste de Scheffe .....	47
Quadro 11 - Avaliação do atributo “verde” através do teste LSD.....	47
Quadro 12 - Avaliação do atributo “amargo” através do teste LSD .....	47
Quadro 13 - Avaliação do atributo “picante” através do teste LSD .....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os depósitos de azeite utilizados nos ensaios. ....	3
Figura 2 – Esquema simplificado da auto-oxidação, adaptado de Velasco, 2002 .....	17
Figura 3 - Depósito de azeite com inertização, adaptado de Air Liquide .....	20
Figura 4 – Determinação do teor de oxigénio nos depósitos com atmosfera inerte.....	23
Figura 5 – Filtração das amostras de azeite.....	24
Figura 6 - espectrofotómetro UV/VIS Spectrometer Lambda 40 da marca Perkin Elmer utilizado para a medição da absorvância. ....	28
Figura 7 - Aparelho Rancimat da Metrohm .....	29
Figura 8 – Extracção dos polifenóis numa ampola de decantação.....	31
Figura 9 – Aparelho HPLC Perkin Elmer utilizado na determinação dos tocoferóis.....	33
Figura 10 - Grau de acidez das amostras recolhidas ao longo de seis meses .....	39
Figura 11 – Índice de peróxidos das amostras recolhidas ao longo de seis meses.....	40
Figura 12 – Absorvância $K_{232}$ das amostras recolhidas ao longo de seis meses.....	41
Figura 13 – Absorvância $K_{270}$ das amostras recolhidas ao longo de seis meses.....	41
Figura 14 – Estabilidade oxidativa das amostras recolhidas ao longo de seis meses .	42
Figura 15 – Polifenóis totais das amostras recolhidas ao longo de seis meses.....	42
Figura 16 – Tocoferóis das amostras recolhidas ao longo de seis meses.....	43
Figura 17 – Triacilgliceróis oxidados das amostras recolhidas ao longo de seis meses	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

HDL – lipoproteínas de alta densidade  
LDL – lipoproteínas de baixa densidade  
% - Percentagem  
mEq – miliequivalentes  
kg – quilograma  
K<sub>232</sub> – valor da absorvância a 232 nm  
K<sub>270</sub> – valor da absorvância a 270 nm  
ΔK – extinção específica no comprimento de onda m  
L – litros  
a.C. – antes de Cristo  
g – gramas  
mg – miligramas  
nm – nanômetros  
°C – graus centígrados  
ml – mililitros  
L/h – litros por hora  
V/V – volume por volume  
h – horas  
N – normalidade  
cm<sup>3</sup> – centímetros cúbicos  
μl – microlitros  
min – minutos  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência  
mm – milímetros  
r.p.m. – rotações por minuto

## 1. INTRODUÇÃO

O azeite foi, desde sempre, extraído apenas por processos mecânicos, sem qualquer manipulação química. A sua importância ao longo dos tempos resultou das múltiplas utilizações que lhe foram dadas: na alimentação, medicina, produto de beleza, combustível para iluminação, lubrificante para as ferramentas e alfaías agrícolas, impermeabilizante para as fibras têxteis e elemento essencial em ritos religiosos (Gouveia, 2002).

As características químicas, biológicas, nutricionais e organolépticas fazem do azeite um produto ímpar muito apreciado. É um produto tradicional da cozinha mediterrânica que confere um gosto e aroma únicos à alimentação, podendo ser usado em cru, ou para cozinhar, especialmente benéfico pelo facto de resistir bastante às agressões provocadas pelo calor.

Além das suas qualidades dietéticas, o azeite ocupa um lugar insubstituível no plano gastronómico. Para além da composição equilibrada em ácidos gordos saturados monoinsaturados e polinsaturados possui ácidos gordos essenciais fundamentais para a sobrevivência humana, teores elevados de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e antioxidantes naturais (tocoferóis e polifenóis) (Campos, 2002). Actualmente, faz parte de uma certa arte de viver e o seu consumo não se restringe às zonas de cultivo da oliveira. É um dos sinais de uma culinária de qualidade, que atribui a cada alimento o lugar que lhe compete numa alimentação inteligente e equilibrada.

Além do cheiro e sabor com que enriquece os alimentos, o azeite é um produto saudável. Está comprovado que tanto a frio como a quente, o azeite reduz a acidez gástrica e exerce uma protecção eficaz de protecção contra úlceras e gastrites. Devido ao facto de ter um elevado coeficiente de assimilação pelo organismo humano, considera-se indispensável para o processo biliar e digestivo, convertendo-se num suave laxante que não irrita o intestino, nem produz contracções fortes na vesícula. O azeite, longe de aumentar o índice de colesterol no sangue, equilibra o “mau” colesterol (LDL) e aumenta o teor de lipoproteínas de alta densidade, o “bom” colesterol (HDL), diminuindo o risco de enfarte. Aparte isso, dificulta a agregação das plaquetas sanguíneas, reduzindo o risco de trombose arterial. Por ser das gorduras comestíveis a mais equilibrada, o azeite favorece o crescimento ósseo normal e permite uma melhor mineralização dos ossos, tanto para as crianças como para os

adultos. O azeite é também indicado para prevenir os efeitos da idade sobre as funções cerebrais e também sobre o envelhecimento dos tecidos e dos órgãos em geral (Granados, 2000).

Segundo Aparício *et al.* (1999) o azeite é uma ótima escolha para confecções envolvendo altas temperaturas, nomeadamente a fritura, dado que é rico em ácidos gordos monoinsaturados, baixo em ácidos gordos saturados e praticamente não contém ácidos gordos trans. O facto de possuir também um baixo ponto de fusão significa que facilmente é “escoado” do produto frito em azeite, garantindo um baixo teor de gordura no alimento frito.

Os países mediterrânicos representam mais de 95% da produção mundial de azeite, advindo 75% dos países da União Europeia (principalmente Espanha, Itália e Grécia). O azeite representa cerca de 4% da produção total de óleos vegetais. A sua produção mundial é de 260 000 toneladas por ano. Devido ao aumento da popularidade da dieta mediterrânica, na qual o azeite possui um elevado peso, o seu consumo encontra-se agora em expansão para países sem tradição em olivicultura, como é o caso dos Estados Unidos da América, Canadá, Austrália, América do Sul e Japão (Visioli *et al.*, 2002).

Hoje em dia, na indústria alimentar, procura-se cada vez mais obter produtos de qualidade e que mantenham durante mais tempo as características químicas, biológicas e organolépticas iniciais. A estabilidade do produto é, portanto, cada vez mais importante.

De acordo com Morelló *et al.* (2004) o consumidor é cada vez mais exigente com a qualidade dos produtos alimentares e com a durabilidade dos mesmos até ao acto de consumo. Estas expectativas têm como consequência a obrigatoriedade de requisitos que conduzem não só à obtenção de produtos seguros mas também com mínimo de resistência às alterações desvantajosas da qualidade sensorial.

A oxidação lipídica é considerada a maior causa de deterioração do azeite virgem pois afecta as suas características químicas, funcionais, nutricionais e sensoriais, provocando o aparecimento de sabores e odores desagradáveis. O fenómeno,

geralmente conhecido como ranço, limita a vida útil do azeite, o que explica o interesse económico que esta informação tem para a indústria alimentar (Baer, 2006).

Com o presente trabalho pretendeu-se determinar a evolução da qualidade do azeite armazenado em depósitos de aço inoxidável, com espaço de cabeça em atmosfera normal em comparação com azeites em depósitos com espaço de cabeça preenchido com gás inerte.



**Figura 1** – Os depósitos de azeite utilizados nos ensaios.

Nos ensaios utilizou-se azeite da variedade arbequina, devido à sua maior instabilidade oxidativa, comparativamente a outros azeites monovarietais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O AZEITE

O azeite, cujo termo é proveniente do vocábulo árabe “Az-zait” (sumo de azeitona), tem sido, ao longo dos tempos, um ingrediente fundamental da dieta da maioria dos países mediterrâneos e vizinhos, pela contribuição das suas propriedades nutricionais e terapêuticas (Neves, 2000).

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI), a denominação de AZEITE é reservada ao óleo proveniente dos frutos da oliveira (*olea europaea L.*), com exclusão dos óleos obtidos por solvente ou por procedimentos de reesterificação, bem como de toda a mistura com óleos de outra natureza.

Para obtenção de um azeite virgem de qualidade é necessário utilizar azeitonas exclusivamente provenientes da árvore, sãs, que se encontrem no ponto óptimo de maturação, recém colhidas, e ser muito exigente com o estado dos materiais que vão estar em contacto com o azeite, com as condições gerais de limpeza e higienização e, ainda, com os cuidados postos em toda a laboração, nomeadamente no controlo das temperaturas utilizadas (Carrilho, 2003). O processamento, se não for realizado nas melhores condições afecta grandemente a qualidade do azeite (Vaz-Freire, 2008).

De acordo com a legislação vigente (Regulamento (CE) nº 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004, anexo I), o azeite pode ser classificado da seguinte forma:

Azeites Virgens: Azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Os azeites virgens, de acordo com a sua qualidade são classificados e denominados do seguinte modo:

- a) Azeite virgem extra: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g.

**A INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE GÁS INERTE NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS AZEITES VIRGENS  
NOS DEPOSITOS DE ARMAZENAMENTO**

---

- b) Azeite virgem: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g.
- c) Azeite lampante: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g.

Azeite refinado: Azeite obtido por refinação de azeite virgem, com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 0,3 g por 100 g.

Azeite: contém azeite refinado e azeite virgem - Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g.

No quadro 1 apresenta-se os valores permitidos para cada categoria de azeite. A qualidade do azeite é avaliada por quatro parâmetros: grau de acidez, índice de peróxidos, absorvência no ultravioleta e análise sensorial (Granados, 2000).

**Quadro 1** – Características conformes para cada categoria de azeite.

<b>Categoria do azeite</b>	<b>Índice de peróxidos (mEq O<sub>2</sub>/Kg)</b>	<b>K<sub>232</sub></b>	<b>K<sub>270</sub></b>	<b>ΔK</b>
Azeite virgem extra	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Azeite virgem	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Azeite lampante	-	-	-	-
Azeite refinado	≤ 5	-	≤ 1,10	≤ 0,16
Azeite	≤ 15	-	≤ 0,90	≤ 0,15

Fonte: adaptado de Regulamento (CE) n.º 640/2008 do Conselho de 4 de Julho de 2008

O grau de acidez mede a quantidade de ácidos gordos livres, expresso em ácido oleico. É um parâmetro negativo que a partir de certos limites constitui um inconveniente para a sua utilização na alimentação. Segundo a regulamentação técnico-sanitária apenas é apto para consumo humano até 2,0%. A acidez é uma anomalia que resulta entre outras, do mau estado dos frutos, de mau processamento ou de má conservação do azeite (Granados, 2000).

O índice de peróxidos mede o estado de oxidação inicial, e também indica a deterioração que certos componentes, de interesse nutricional, como as vitaminas,



podem ter sofrido. Os seus limites de consumo estão fixados em 20 mEq O<sub>2</sub>/kg (Granados, 2000).

A absorvância no ultravioleta (K<sub>270</sub>) utiliza-se, especialmente, para detectar os componentes oxidados anormais em um azeite virgem. Num azeite obtido de uma azeitona sã, que não tenha sido submetido a nenhum tratamento diferente das operações físicas próprias da sua extracção, o seu valor é geralmente inferior aos limites estabelecidos. Nos azeites virgens extra o valor limite é de 0,22, podendo este valor ir até a um máximo de 1,20 para o caso de azeites refinados (Granados, 2000).

A análise sensorial avalia as características organolépticas nomeadamente o cheiro e sabor (Granados, 2000). O azeite é classificado nas diferentes categorias, em função da mediana dos defeitos e da mediana do atributo “frutado”. Entende-se por “mediana dos defeitos” a mediana do defeito a que tenha sido atribuída a intensidade mais elevada. A mediana dos defeitos e a mediana do frutado são expressas com uma única casa. Classifica-se um azeite por comparação do valor da mediana dos defeitos e da mediana do frutado com os intervalos de referência a seguir indicados. Dado que os limites dos intervalos foram estabelecidos tendo em conta o erro do método, são considerados absolutos.

- a) Azeite virgem extra: mediana dos defeitos igual a 0 e mediana do frutado superior a 0;
- b) Azeite virgem: mediana dos defeitos superior a 0 e inferior ou igual a 3,5 e mediana do frutado superior a 0;
- c) Azeite lampante: mediana dos defeitos superior a 3,5; ou mediana dos defeitos inferior ou igual a 3,5 e mediana do frutado igual a 0 (Regulamento (CE) nº 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004).

Aos azeites virgens exige-se a prova organoléptica ou análise sensorial. As suas características organolépticas são definidas por um painel de provadores, seleccionados e treinados para o efeito. As sensações detectadas pelos provadores têm, fundamentalmente a ver com cheiro e sabor.

Os principais atributos positivos que um azeite pode apresentar são:

- Frutado: conjunto das sensações olfactivas dependentes da variedade de azeitona, por via directa e/ou retronasal, características dos azeites

provenientes de frutos são e frescos, verdes ou maduros. Ao atributo frutado associa-se o qualificativo verde quando as sensações olfactivas lembram as de frutos verdes, características do azeite proveniente de frutos verdes. Ao atributo frutado associa-se o qualificativo maduro quando as sensações olfactivas lembram as de frutos maduros, características do azeite proveniente de frutos verdes e maduros.

- Amargo: gosto elementar característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação, sentido pelas papilas caliciformes que constituem o v lingual.
- Picante: sensação tátil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, característica dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.
- Doce: Trata-se de um azeite que dá uma sensação doce na boca, notada na parte anterior da língua, sem se tratar de um produto açucarado. O sabor doce mascara o sabor amargo e picante do azeite.
- Verde - aroma característico do azeite obtido a partir de azeitonas demasiado verdes ou que foram moídas juntamente com folhas e troncos.

Relativamente aos atributos negativos os mais importantes/comuns são:

- Tulha/Borra: “flavour” característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocaram num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contacto, nos depósitos e reservatórios, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.
- Mofo-húmido: “flavour” característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições húmidas.
- Avinhado-avinagrado/Ácido-azedo: “flavour” característico de certos azeites que lembra o vinho ou o vinagre. Deve-se, fundamentalmente, a um processo fermentativo aeróbio das azeitonas ou de restos de pasta de azeitona em

capachos que não foram lavados correctamente, que leva à formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

- Metálico: “flavour” que lembra os metais e é característico dos azeites que permaneceram prolongadamente em contacto com superfícies metálicas durante os processos de trituração, malaxagem, prensagem ou armazenagem.
- Ranço: “flavour” dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso. (Regulamento (CE) n.º 640/2008 do Conselho de 4 de Julho de 2008).

### **2.1.1. Composição química do azeite**

De acordo com Aparício e Harwood (2003) os triglicéridos (ésteres de ácidos gordos e glicerina) constituem 98-99% do azeite. A composição do azeite em ácidos gordos varia com a variedade da azeitona, as condições climáticas e a localização geográfica do olival.

A maior parte dos ácidos gordos presentes no azeite são insaturados, com incidência de ácidos gordos monoinsaturados, presentes em proporções que variam entre 55 e 80% do total dos ácidos gordos. Os ácidos gordos polinsaturados representam 4 a 20% e os ácidos saturados 5 a 15% do total (Gouveia, 1995). Existem também, em menor proporção, ácidos gordos livres (0,5 a 1% do total) (Boskou, 1998).

O azeite apresenta um perfil de ácidos gordos característico, onde predomina o ácido oleico. Mas também estão presentes, em quantidades significativas, o ácido palmítico, o ácido palmitoleico, o ácido esteárico e o ácido linoleico (Monteiro, 1999). O facto de o azeite virgem ser constituído, maioritariamente, por ácido oleico faz com que ocupe uma posição ímpar, relativamente aos outros óleos vegetais, uma vez que este ácido é menos susceptível à oxidação do que os ácidos linoleico e linolénico (Baer, 2006). No quadro 2 estão indicados os ácidos gordos que fazem parte da constituição normal de um azeite e os seus valores percentuais.

**Quadro 2** - Composição dos ácidos gordos presentes no azeite

Ácidos gordos		Limites (%)
Mirístico	C 14:0	0,0 – 0,1
Palmítico	C 16:0	7,5 – 20,0
Palmitoleico	C 16:1	0,3 – 3,5
Margárico	C 17:0	0,0 – 0,5
Margaroleico	C 17:1	0,0 – 0,6
Estearico	C 18:0	0,5 – 5,0
Oleico	C 18:1	55,0 – 83,0
Linoleico	C 18:2	3,5 – 21,0
Linolénico	C 18:3	0,0 – 1,5
Araquídico	C 20:0	0,0 – 0,8
Gadoleico	C 20:1	Não especificado
Beénico	C 22:0	0,0 – 0,2
Lignocérico	C 24:0	0,0 – 1,0

Fonte: adaptado de Boskou, 1998

Quimicamente, o azeite é constituído por duas fracções: uma saponificável e outra insaponificável (Gouveia, 1995). Os triglicéridos representam a “fracção saponificável”, sendo os restantes componentes minoritários, denominados no seu conjunto como “fracção insaponificável” (Boskou, 1998).

Segundo Gouveia (1995) e Gutiérrez *et al.* (2005) a fracção insaponificável é solúvel em água e representa cerca de 2% da massa total do azeite e inclui mais de 230 compostos químicos. Esta fracção é a principal responsável pelo valor biológico e nutricional do azeite, pelas suas características organolépticas e, ainda, pela sua resistência à oxidação. É formada essencialmente por:

- Hidrocarbonetos
- Fosfolípidos
- Esteróis
- Álcoois alifáticos
- Ceras
- Compostos fenólicos
- Pigmentos
- Vitaminas
- Tocoferóis
- Compostos voláteis e aromáticos

### Hidrocarbonetos

Segundo Boskou (1998) no azeite estão presentes dois hidrocarbonetos em quantidades consideráveis: o esqualeno e o  $\beta$ -caroteno (pertencendo este último à secção dos pigmentos). O esqualeno é o precursor bioquímico da biossíntese dos esteróis. É o principal constituinte da fracção insaponificável, representando cerca de 40% do total desta fracção. Existem outros hidrocarbonetos em quantidades menores como é o caso de hidrocarbonetos de cadeia ramificada ou hidrocarbonetos policíclicos (como o naftaleno ou o pireno) (Campos e Mourato, 2002).

### Fosfolípidos

O azeite recém produzido pode conter pequenas quantidades de fosfolípidos (40-135 mg/kg). Os azeites mais velhos contêm quantidades muito mais pequenas. Os fosfolípidos estão parcialmente ligados às lipoproteínas (Boskou, 1998).

### Esteróis

Os principais esteróis do azeite são o  $\beta$ -sitosterol (70 a 90% do total),  $\Delta$ -5-avenasterol (5 a 20% do total), campesterol (1 a 5% do total) e estigmasterol (0,5 a 2% do total) (Boskou, 1998). Em quantidades menores existem: o colesterol, campestanol,  $\Delta$ -7-campestanol, clerosterol,  $\Delta$ -5-avenasterol,  $\Delta$ -5,24-estigmastadieno,  $\Delta$ -7-estigmasterol e  $\Delta$ -7-avenasterol (Aparício e Harwood, 2003).

### Álcoois alifáticos

Os álcoois alifáticos, de 22 a 28 átomos de carbono, estão presentes no azeite em quantidades muito pequenas. Os álcoois primários de longa cadeia carbonada podem derivar de ácidos gordos por conversão do grupo carboxílico a hidroximetilénico ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ). Álcoois até 22 átomos de carbono são álcoois gordos e os de cadeia hidrocarbonatada mais longa são álcoois cerosos (Gouveia, 1995).

Foram também identificados no azeite dois álcoois terpénicos: o eritrodiol e o uvaol. Os óleos extraídos com solventes contêm quantidades maiores de ceras e de eritrodiol e uvaol que óleos extraídos a frio, logo é uma forma de detecção de fraude determinar o teor destes compostos no azeite (Aued-Pimentel, 2008).

### Ceras

As ceras são ésteres de álcoois, de longa cadeia alifática, e ácidos gordos. Encontram-se nos óleos vegetais como meros contaminantes, originários dos tegumentos das sementes e dos epicarpos dos frutos (Gouveia, 2005).

### Compostos fenólicos

Os azeites virgens são uma rica fonte natural de antioxidantes. Inclui os carotenóides, tocoferóis e os compostos fenólicos (Morelló *et al.*, 2004).

O azeite virgem tem substâncias fenólicas que afectam a sua estabilidade, sabor e aroma. Os compostos fenólicos presentes no azeite caracterizam-se, convencionalmente, por polifenóis (Boskou, 1998).

Os compostos fenólicos são considerados os principais antioxidantes num azeite virgem, tendo a capacidade de doar um átomo de hidrogénio a um radical lipídico, formado durante a fase de propagação na auto-oxidação (Morelló *et al.*, 2004).

O principal glicósido presente no azeite é a oleuropeína. Este glicósido é responsável pelo sabor amargo das azeitonas verdes. A sua percentagem diminui de forma significativa ao alcançar a maturação completa. Durante a maturação do fruto e durante o processamento das azeitonas, tem lugar uma série de reacções químicas e enzimáticas, que originam fenóis livres. Estes últimos, se bem que são compostos polares, são retidos em quantidades muito pequenas no azeite (Boskou, 1998).

O teor de polifenóis pode oscilar entre 50 e 200mg/kg, embora se possa encontrar azeites que chegam a ter 1000 mg/kg (Boskou, 1998).

O grau de maturação da azeitona, na altura da apanha, as condições climáticas e as características do solo influenciam a composição fenólica do azeite virgem, mais do que a variedade (Aparício e Harwood, 2003).

Os componentes fenólicos são metabolitos das plantas bioenergéticamente relacionados que têm um grande impacto na qualidade sensorial e nutricional do azeite. A presença de polifenóis no azeite virgem está relacionada com a estabilidade oxidativa e com a qualidade sensorial do azeite (Aparício e Harwood, 2003).

A espectrometria no ultravioleta é extremamente útil para a identificação de polifenóis. A região do espectro que se faz o varrimento é normalmente de 230-290 nm (Aparício e Harwood, 2003).

### Vitaminas

As vitaminas lipossolúveis também estão presentes no azeite. As principais vitaminas são a A, D, E (ou  $\alpha$ -tocoferol) e K (Gouveia, 1995).

### Pigmentos

O azeite possui uma cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo do estado de maturação dos frutos e da composição e conteúdo total de pigmentos presentes. Podem-se encontrar no azeite duas classes de pigmentos: os carotenóides e as clorofilas e feofitinas (Boskou, 1998).

Os principais carotenóides presentes no azeite são a luteína, o  $\beta$ -caroteno, a violaxantina e a neoxantina. Os carotenóides, em particular o  $\beta$ -caroteno, são eficientes antioxidantes. Normalmente, o conteúdo total de carotenóides varia entre 1 a 20 mg/kg. O  $\beta$ -caroteno encontra-se em concentrações que variam entre 0,5 e 4 mg/kg (Morelló *et al.*, 2004).

A estabilidade oxidativa do azeite também é afectada pela presença de clorofilas e seus derivados, especialmente na presença de luz, dado que estas possuem a capacidade de transferir energia da luz para as moléculas (Aparício *et al.*, 1999).

### Tocoferóis

Os tocoferóis contribuem de forma importante para a estabilidade do azeite e tem um papel biológico benéfico como antioxidante. Dado que são fáceis de oxidar, os tocoferóis são excelentes agentes antioxidantes naturais e conferem estabilidade (Aparício e Harwood, 2003).

Segundo Boskou (1998) e Aparício e Harwood (2003) a concentração de tocoferóis no azeite oscila entre 125 e 300 mg/kg. Em geral nos azeites de boa qualidade, é superior a 100 mg/kg. O precursor da vitamina E presente no azeite é o  $\alpha$ -tocoferol,

representando geralmente 95% do total de tocoferóis. O  $\gamma$ -tocoferol representa, geralmente, apenas 5%.

No caso da variedade arbequina o  $\gamma$ -tocoferol não existe na sua composição.

#### Compostos voláteis e aromáticos

Foram identificados mais de 100 compostos aromáticos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis e seus derivados, terpenos oxigenados e derivados do furano. Nem todos são aromáticos. O hexano, o octano e alguns derivados do furano não têm cheiro. Outros, devido às concentrações que se encontram no azeite, têm uma contribuição muito pequena no aroma e no sabor (Morelló *et al.*, 2004).

A presença de compostos voláteis no azeite devem-se essencialmente à cultivar (Aparício e Harwood, 2000).

#### **2.1.2. Reacções de degradação do azeite**

O desenvolvimento do ranço é conhecido como a causa predominante da deterioração do azeite (Morelló *et al.*, 2004). As reacções de degradação do azeite causam importantes alterações na sua composição química, e nas propriedades sensoriais e nutritivas (Velasco e Dobarganes, 2002).

Os efeitos da pós-colheita e do armazenamento fomentam uma oxidação gradual dos lípidos, o que produz uma diminuição da estabilidade, o tempo de vida útil, devido a processos químico-orgânicos contínuos, desencadeados pelas peroxidações iniciais. Os efeitos do armazenamento pós-colheita da azeitona e o posterior processamento sobre a oxidação lipídica são de grande interesse no caso do azeite. O azeite oxida-se quando em contacto com o oxigénio, existindo certas substâncias presentes no tecido celular da planta que retardam a oxidação (antioxidantes). Os ácidos gordos essenciais, como o linoleico e o linolénico e certas vitaminas lipossolúveis diminuem de teor quando o azeite se oxida (Aparício e Harwood, 2003).



Segundo Villalta (1999) existem quatro factores que podem favorecer o processo de oxidação:

- Contacto com o ar - o oxigénio é a causa da oxidação, quanto mais tempo o azeite estiver em contacto com este mais se irá favorecer o processo de degradação. A agitação, as trasfegas, o enchimento dos depósitos e a superfície de contacto no espaço de cabeça são os aspectos a ter em atenção. No princípio é um processo lento devido à presença de antioxidantes mas quando atingido um determinado nível de peróxidos a velocidade da reacção acelera e surge o cheiro a ranço.
- Temperatura - acelera a auto-oxidação quando superior a 20°C, favorecendo a formação de peróxidos e posterior decomposição em aldeídos e cetonas.
- Luz - tal como a temperatura, favorece a reacção do azeite com o oxigénio.
- Presença de metais - mesmo em pequenas quantidades, estes produzem um efeito catalizador da auto-oxidação e rancificação do azeite, concedendo por vezes um sabor metálico a este. Os metais mais activos são o ferro e o cobre (presentes em depósitos mais antigos).

A temperatura e a luz são facilmente controláveis. A ausência de metais é alcançada através de uma correcta selecção dos materiais usados nos lagares e de uma limpeza eficiente dos equipamentos e depósitos. O factor mais difícil de controlar será o contacto do oxigénio com o azeite. Um depósito de azeite pode conter um volume de ar de cerca de 5% (Giovacchino, 2007).

A estabilidade oxidativa é um importante parâmetro na avaliação da qualidade do azeite e dá uma boa estimativa da susceptibilidade da degradação oxidativa, a principal causa da alteração daquele (Aparício *et al.*, 1999).

Alguns dos parâmetros relacionados com a deterioração oxidativa do azeite incluem-se nas regulamentações oficiais. Estas incluem a determinação do índice de peróxidos, absorvência no ultravioleta e análise da acidez livre.

O azeite virgem possui uma elevada resistência à deterioração oxidativa, devido principalmente a duas razões: em primeiro, a sua composição em ácidos gordos

caracterizada por um elevado rácio entre os ácidos gordos monoinsaturados e os polinsaturados, e em segundo lugar, a grande variedade de compostos menores com actividade antioxidante, entre os quais se destaca os polifenóis (Velasco e Dobarganes, 2002).

Quando os lípidos se oxidam formam-se hidroperóxidos, os quais são susceptíveis de uma posterior oxidação ou decomposição em produtos secundários da reacção, tais como aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois. Em muitos casos, estes compostos afectam negativamente o “flavour”, aroma, sabor, valor nutricional e qualidade sensorial global (Aparício e Harwood, 2003).

Segundo Velasco *et al.* (2002) os três principais processos de oxidação do azeite são a oxidação enzimática, a foto-oxidação e a auto-oxidação.

#### Oxidação Enzimática

Segundo Aparício e Harwood (2003) ocorre degradação dos lípidos nos tecidos das plantas. A decomposição dos ácidos gordos insaturados ocorre com a actuação de diferentes acções enzimáticas. A sequência começa com a hidrólise de vários glicéridos por lipases, acil-hidrolases lipolíticas e fosfolipases, durante a qual se libertam os ácidos gordos polinsaturados. As lipoxigenases convertem os ácidos gordos insaturados em hidroperóxidos, principalmente isómeros 9 e 13, os quais são instáveis. Na última fase, as liases, isomerases e desidrogenases transformam os hidroperóxidos em uma grande variedade de produtos, sendo alguns deles voláteis. Os componentes formados do “flavour”, tais como os aldeídos e álcoois, podem ser directamente responsáveis na formação do “flavour” desagradável.

As condições ideais para a oxidação enzimática ocorrem com a presença de oxigénio, alcançando-se níveis de oxidação mais elevados. A ausência de oxigénio não interrompe a oxidação porque algumas formas de lipoxigenases podem oxidar os ácidos gordos sem a presença de oxigénio, formando, desta maneira, radicais livres (Aparício e Harwood, 2003).

A oxidação enzimática começa a actuar no momento em que se produz algum dano no tecido do fruto, seja durante o seu desenvolvimento, na colheita, no armazenamento ou no processamento das azeitonas. As enzimas envolvidas no processo podem encontrar-se naturalmente na azeitona. A formação de pequenas

quantidades de hidroperóxidos na azeitona pode ter um efeito de aceleração sobre a oxidação do azeite resultante. Os radicais livres formados pela decomposição de hidroperóxidos podem intensificar mais a oxidação, a qual produz a formação do “flavour” desagradável, resultando de uma menor estabilidade durante o armazenamento do azeite (Aparício e Harwood, 2003).

#### Foto-oxidação

A maior parte dos azeites possuem compostos fotossensíveis que se activam quando expostos à luz durante a sua distribuição comercial. A exposição à luz pode conduzir à formação de hidroperóxidos quando está presente tanto o oxigénio como a luz. O processo de formação dos hidroperóxidos pode ter lugar quer pela foto-oxidação quer pela auto-oxidação fotolítica. Pode-se iniciar mais tarde por decomposição fotolítica dos peróxidos e hidroperóxidos presentes no azeite, onde a radiação ultravioleta pode ter um efeito mais pronunciado. Inicia-se e propaga-se mediante as reacções dos radicais livres, formando-se isómeros similares aos dos hidroperóxidos formados durante a auto-oxidação na ausência de luz (Aparício e Harwood, 2003).

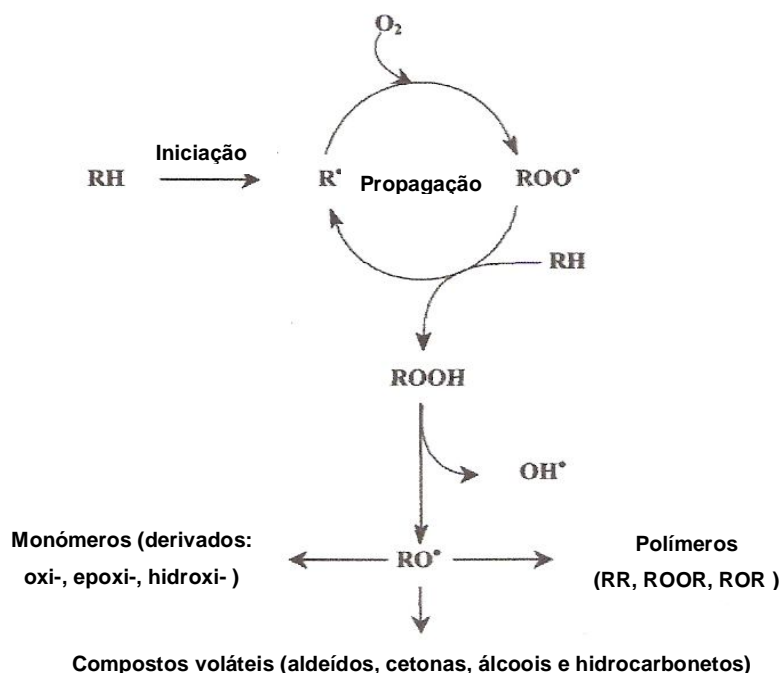
#### Auto-oxidação

Segundo Boskou (1998) a auto-oxidação é uma reacção entre os ácidos gordos insaturados e o oxigénio.

As ligações duplas dos ácidos gordos exercem uma força atractiva nos electrões de ligação de um dos átomos de hidrogénio do grupo metílico próximo do outro grupo  $\alpha$ -metílico activo, ou seja, o átomo de hidrogénio é lábil por estar ligado a um átomo de carbono adjacente a uma ligação dupla. Esse átomo de hidrogénio é facilmente eliminado em condições de indução, como seja a temperatura, luz e oxigénio (Gouveia, 1995).

De acordo com Gouveia (1995) forma-se então um radical livre na cadeia do ácido gordo. A remoção deste átomo de hidrogénio é fácil se o grupo  $\alpha$ -metílico estiver situado entre duas ligações duplas, como acontece, naturalmente, com os ácidos linoleico e linolénico. Se a introdução de oxigénio livre for muito abundante, pode ocorrer ao nível da ligação dupla uma cisão e a formação de dois ácidos, um monoácido e um diácido. Se a oxidação for menos intensa, não se rompe a ligação dupla e formam-se epóxidos, peróxidos ou ainda glicóis.

O mecanismo da auto-oxidação dos lípidos descreve-se como um processo de três etapas: iniciação, propagação e terminação (Aparício e Harwood, 2003).



**Figura 2** – Esquema simplificado da auto-oxidação, adaptado de Velasco, 2002

As reacções de iniciação dão lugar à formação de radicais livres, a partir de ácidos gordos não saturados ( $RH$ ) ou de peróxidos lipídicos, e não podem ser evitadas pela adição de antioxidantes (Gouveia, 1995).

Na propagação ocorre a transformação em peróxidos, os quais se ligaram a hidrogénio pertencente a outras moléculas lipídicas e se transformaram em hidroperóxidos (Aparício e Harwood, 2003).

Na terminação dá-se a destruição destes, com formação dos produtos secundários de oxidação. Os hidroperóxidos ( $ROOH$ ) são compostos bastante instáveis e reactivos, que se decompõem rapidamente, sob o efeito do calor e da luz (sobretudo as radiações ultravioletas) ou pela presença de catalisadores metálicos (Gouveia, 1995).

Os produtos secundários de oxidação são compostos estáveis, de natureza vária, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos epóxidos e ainda oxiácidos e oxipolímeros (Gouveia, 1995).

Em qualquer uma destas vias, o oxigénio do ar reage com os ácidos gordos, principalmente os insaturados na forma livre, e também com os glicéridos, fosfolípidos,

alguns hidrocarbonetos, como seja o esqualeno, e ainda com as vitaminas (A e E), os polifenóis e os pigmentos carotenóides. A oxidação das vitaminas A e E e dos carotenóides pode ser devida também à acção dos peróxidos, formados a partir dos ácidos gordos insaturados: é a oxidação secundária (Gouveia, 1995).

Tanto num caso como noutro, a oxidação conduz a perdas de actividade vitamínica e de cor, assim como a oxidação dos ácidos gordos essenciais provoca uma diminuição do seu valor nutricional e pode mesmo dar origem à formação de produtos cancerígenos (Gouveia, 1995).

Alguns componentes contribuem com algum peso para a estabilidade oxidativa do azeite, como é o caso dos compostos fenólicos com cerca de 30%, os ácidos gordos presentes na composição com 27%,  $\alpha$ -tocoferol com cerca de 11% e os carotenóides com 6% (Morelló *et al.*, 2004).

### **2.1.3. Armazenamento do azeite**

Por vezes é necessário armazenar azeite durante meses. Se não são tomadas as precauções necessárias para evitar a sua deterioração, durante o armazenamento pode ocorrer um aumento da acidez devido à oxidação enzimática e à auto-oxidação (Boskou, 1998).

Segundo Fernández (1991) e Aparício e Harwood (2003) um depósito de azeite deve apresentar as características seguintes:

- Deve ser construído em materiais impermeáveis ao azeite para que este não penetre na superfície do depósito, pois isto dificultará a limpeza e poderá favorecer possíveis alterações.
- O material usado para a construção dos depósitos tem de ser inerte, isto é, não apresentar a menor actividade físico-química; caso contrário pode produzir contaminações no azeite, transferindo para este sabores e odores estranhos, bem como substâncias catalisadoras dos processos oxidativos.

- Deve proteger o azeite da luz e do ar, factores que levam à alteração do produto.
- Deve manter o azeite a uma temperatura relativamente constante, entre os 15-25°C, evitando alterações bruscas de temperatura que podem produzir perda de aromas e oxidações.

Os depósitos ideais devem ser de aço inoxidável dado que outro tipo de depósitos metálicos podem ter um efeito negativo importante sobre a qualidade do aroma e sabor, produzindo a deterioração do azeite (Villalta, 1999).

A base dos depósitos deve estar construída de forma a permitir a decantação das borras do azeite que se vão acumulando no fundo dos depósitos ao longo do tempo de armazenamento (Fernández *et al.*, 1991).

#### **2.1.3.1. Aplicação de gás inerte em depósitos de azeite**

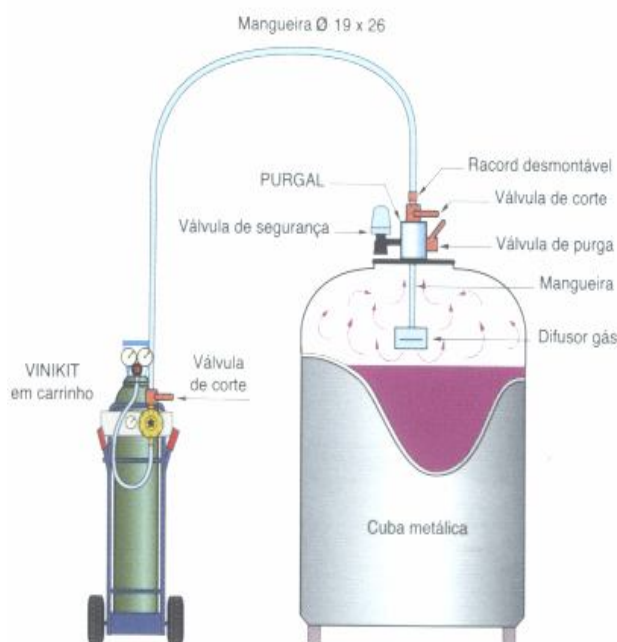
O azoto foi descoberto por Daniel Rutherford em 1772, ao qual chamou ar fixo. Mas foi Lavoisier que, em 1786, o isolou. O nome vem do latim *nitrogenium*. O azoto encontra-se principalmente na atmosfera, onde representa cerca de 78% do volume do ar que respiramos. Mas também se encontra azoto na crosta terrestre, a uma escala limitada (sob a forma de nitratos, etc.), na forma orgânica (vivos ou mortos nas plantas e organismos que formam húmus) e na forma mineral (amónia) e, assim, contribui para a fertilidade do solo. Na forma gasosa, o azoto é um gás incolor, neutro e inerte (não sustenta a vida). Constitui o principal componente do ar atmosférico, com uma percentagem de cerca de 78% (<http://www.airliquide.com/>).

Este gás inerte vem sendo utilizado cada vez com maior frequência na indústria alimentar. Na embalagem ou no armazenamento de alimentos líquidos ou sólidos, o azoto e dióxido de carbono (ou mistura de ambos), desempenham funções muito vantajosas como atmosfera conservante. Estes gases garantem a qualidade dos produtos, protegendo-os da deterioração por oxidação ou das bactérias aeróbias e fungos. Protegido por uma atmosfera de azoto puro, o vinho pode ser armazenado por um longo período de tempo, sem ver alteradas as suas qualidades naturais. O mesmo

gás pode ser utilizado nos depósitos de vinho para homogeneização de misturas, em substituição dos agitadores ou bombas que diminuem significativamente a sua qualidade (<http://www.linde.pt/>).

Em alguns lagares a inertização já é utilizada nos depósitos de azeite. Os depósitos devem ficar cheios, com um espaço de cabeça, como margem de segurança, preenchido com gás inerte. O seu enchimento, se se processar a partir do cimo, deverá fazer com ajuda de tubagem purgada, previamente com gás inerte, prevenindo o arejamento e a oxidação do azeite.

Na figura 3 está representado um exemplo de inertização de um depósito. O purgal é um dispositivo constituído por um difusor, válvulas de isolamento e purga e é equipado com uma válvula de sobrepressão/depressão. Destina-se à inertização de um depósito que previamente não estava equipado para tal e permite a injeção de azoto e a evacuação do ar por efeito pistão (que sai pela válvula de segurança).



**Figura 3** - Depósito de azeite com inertização, adaptado de Air Liquide

## 2.2. VARIEDADE ARBEQUINA

Segundo Granados (2000) o nome da azeitona arbequina está relacionado com a cidade de Aberca, ou mais precisamente na comarca de Leridana de Garrigues. Acredita-se que esta variedade chegou à península Ibérica pelas mãos do Duque de Médici. A sua principal área de cultivo é a Catalunha, mas pode ser encontrada também em Aragón e, mais recentemente, na Andaluzia, e fora de Espanha, principalmente na Argentina.

Trata-se de uma variedade de oliveiras de dimensões reduzidas – em raras ocasiões a árvore supera os três metros de altura – que se adapta a terrenos pobres. É resistente ao frio. A época de floração tem lugar desde a segunda quinzena de Maio até ao princípio de Junho, enquanto que a maturação se dá a partir da segunda quinzena de Novembro (Granados, 2000).

A colheita desta variedade de azeitona é mais trabalhosa e tem um elevado custo, pelos seguintes factos: fruto de pequeno tamanho e de pouco peso, a abundância de ramos, os frutos são relativamente mais presos aos raminhos, com maior dificuldade de se soltarem e, ao mesmo tempo, os ramos são mais flexíveis. Por todos estes factores a colheita da azeitona arbequina faz-se, predominantemente, de maneira manual (Granados, 2000).

A azeitona arbequina é curta, de forma ovalada e quase simétrica. Tem uma baixa relação polpa/carço e pequeno tamanho, e por isso a dificuldade da colheita mecanizada. É uma variedade muito apreciada pela sua precocidade, elevada produtividade, bom rendimento de gordura (em torno de 20,5%) e pelo excelente paladar de seu azeite. A película da azeitona arbequina é rica em clorofila e com pouco teor de gordura. A presença da clorofila é muito importante pois tem um efeito antioxidativo, em ambiente escuro, protegendo a gordura da acção do oxigénio durante o processo de extracção. Quando começa a colheita, as azeitonas são muito verdes e isso reflecte-se sobre as características organolépticas do azeite. Normalmente, as azeitonas não chegam nunca à maturação total. Os azeites são ligeira a mediamente frutados, ligeiramente verdes e mediamente amargos, picantes e doces. São azeites com atributos muito equilibrados, com sabores mais verdes, amargos e picantes no início da colheita e mais doces no final. À parte desses atributos podemos destacar o odor e sabor amendoado (amêndoa verde) e a tomate



verde, e a fluidez que dão uma sensação agradável ao serem degustados ([http://www.vea.es/688\\_spanish/la\\_arbequina\\_web.htm](http://www.vea.es/688_spanish/la_arbequina_web.htm)).

A azeitona arbequina utiliza-se principalmente para transformação em lagar, porque a qualidade do seu azeite, apesar da sua relativa baixa estabilidade, é muito apreciado mundialmente pelas suas notáveis características organolépticas, e especialmente recomendado para o tempero de saladas, verduras, ou mesmo para o puro prazer de molhar o pão com este aromático azeite (Granados, 2000).

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Colocou-se azeite da variedade arbequina em seis depósitos, com capacidade de 5 L, três dos quais a atmosfera “normal” e três depósitos cuja atmosfera apenas contem azoto. Todos os depósitos foram colocados numa sala cuja temperatura foi mantida entre 15 e 20°C.

A verificação da integridade dos depósitos com atmosfera de azoto foi avaliada todos os meses, na altura da recolha das amostras do azeite, recorrendo a um analisador de oxigénio, garantindo assim a ausência deste nos depósitos. De duas em duas semanas os depósitos com azoto, foram inertizados, de forma a garantir a presença de azoto e a ausência de oxigénio.



**Figura 4** – Determinação do teor de oxigénio nos depósitos com atmosfera inerte

Ao longo destes seis meses foram recolhidas amostras, mensalmente, de cada depósito e procedeu-se às análises seguintes: acidez, índice de peróxidos, absorvências no ultravioleta, tocoferóis, polifenóis totais, estabilidade oxidativa, triacilgliceróis oxidados e análise sensorial.

As análises decorreram no Laboratório de Estudos Técnicos (LET), do Instituto Superior de Agronomia.

### 3.1. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de azeite colhidas foram, previamente, filtradas antes de se proceder às análises. Recolheu-se uma amostra, de cada depósito, com cerca de 150 ml de azeite, e adicionou-se cerca de 75 g de sulfato de sódio anidro. Preparou-se um funil com papel de filtro e colocou-se a amostra a filtrar para uma garrafa de cor âmbar (para que não ocorresse foto-oxidação).

As análises da acidez, índice de peróxidos e índice espectrofotométrico foram efectuadas de acordo com o Regulamento (CE) nº 2568/91, da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.



**Figura 5** – Filtração das amostras de azeite

### 3.1.1. Controlo laboratorial químico

#### 3.1.1.1. Acidez

A acidez mede a percentagem de ácidos gordos que estão livres da estrutura dos triacilgliceróis (expressa em % de ácido oleico). É importante saber este valor dado que no processo de auto-oxidação, os ácidos gordos livres oxidam-se mais facilmente do que estando esterificados no glicerol.

A determinação da acidez baseia-se na neutralização dos ácidos gordos livres. Para tal pesou-se 10 g da amostra de azeite num balão erlenmeyer, adicionou-se 60 ml de uma mistura éter/etanol (1:1, V/V) previamente neutralizada. Titulou-se, com agitação, com uma solução aquosa de hidróxido de sódio, na presença de um indicador (fenolftaleína) até à viragem deste.

O resultado da determinação é dado pela relação:

$$^{\circ}Ac = \frac{V \times 2,82}{m}$$

$^{\circ}Ac$  – grau de acidez, em %

V – volume de hidróxido de sódio, 0,1N, gasto na titulação, em cm<sup>3</sup>

m – massa de gordura, em gramas

2,28 – Factor resultante da massa molecular do ácido oleico

A determinação foi efectuada de acordo com o Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo II.

#### 3.1.1.2. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos define-se pela quantidade de oxigénio activo, expressa em miliequivalentes, contida em um quilograma de gordura ou óleo. Os hidroperóxidos são os primeiros produtos resultantes da oxidação do azeite, formando-se, pelo menos

durante as etapas iniciais, a um ritmo paralelo à quantidade de oxigénio absorvido. (Baer, 2006 in Ruiz, L. *et al.*, 1991).

Segundo Gouveia (1995), os hidroperóxidos são compostos muito instáveis que, por decomposição, dão origem a produtos carbonílicos, com moléculas pequenas, que modificam o “flavour” das gorduras, mas que não são mensuráveis por este índice. Portanto, o índice de peróxido, só constitui uma medida útil do grau de oxidação no princípio da reacção.

A determinação do índice de peróxidos baseia-se na oxidação do iodeto de potássio, em meio acético, pelo oxigénio activo de uma massa de azeite. Para a sua determinação pesou-se 2 g de amostra para um balão erlenmeyer com tampa e adicionou-se 10 ml de clorofórmio e 15 ml de ácido acético glacial e dissolveu-se a toma sob agitação. De seguida adicionou-se 1 ml de solução saturada de iodeto de potássio, tapou-se rapidamente, agitou-se durante um minuto e deixou-se exactamente cinco minutos na ausência de luz a uma temperatura de 15 a 20°C. Adicionou-se 75 ml de água e de seguida o iodo livre é titulado pelo tiossulfato de sódio, na presença de 2 ml de amido como indicador.

O índice de peróxidos, é dado pela seguinte fórmula:

$$I.P. = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

I.P. – índice de peróxidos expresso em miliequivalentes de oxigénio activo por kg

V – número de mililitros de solução de tiossulfato de sódio utilizada

N – normalidade exacta da solução de tiossulfato de sódio utilizada

m – massa, em gramas, da toma da amostra

A determinação foi efectuada de acordo com o Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo III.

### 3.1.1.3. Índice espectrofotométrico

Este método é utilizado como medida dos produtos secundários da oxidação, formados a partir da decomposição dos hidroperóxidos.

Durante a oxidação formam-se radicais livres nos grupos metilenos entre as ligações duplas. Esta situação é, no entanto, instável, e conduz à formação de sistemas conjugados, mais estáveis, constituídos por duas ligações duplas separados apenas por uma ligação simples, que absorvem preferencialmente a um comprimento de onda de 232 nm. Os compostos carbonílicos (produtos secundários da oxidação), nos quais os grupos cetonas estão conjugados com as ligações duplas, têm o máximo de absorção a cerca de 270 nm. A desidratação dos hidroperóxidos, com a consequente formação de ácidos, assim como a desidratação de dienos conjugados conduzem à formação de trienos conjugados. Os trienos conjugados absorvem com valores máximos a três comprimentos de onda à volta de 264, 268 e 272 nm (Gouveia, J., 1995).

Neste trabalho foi utilizado um espectrofotómetro UV/VIS Spectrometer Lambda 40 da marca Perkin Elmer.

Pesou-se dois balões volumétricos de 25 ml com 0,0500 g e 0,2500 g de amostra, respectivamente, e adicionou-se iso-octano até perfazer o volume. Efectuou-se leituras na gama dos 232 nm para o primeiro balão e 264, 268, 269, 270, 271 e 272 nm para o segundo balão.

Os coeficientes de extinção específica obtêm-se a partir da Lei de Lambert-Beer, através da seguinte fórmula (Karim, 1998):

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{c}$$

$K_{\lambda}$  – extinção específica no comprimento de onda  $\lambda$

$E_{\lambda}$  – extinção específica no comprimento de onda  $\lambda$

$c$  – concentração da solução em g/100ml

A análise espectrofotométrica do azeite de acordo com o método oficial dos regulamentos oficiais da Comunidade Europeia prevê a determinação de extinção específica em solução no iso-octano, nos comprimentos de onda  $m$ , sendo a determinação de  $\Delta K$  efectuada segundo:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

$K_m$  representa a extinção específica no comprimento de onda  $m$ , correspondente a um valor máximo de absorvância na gama de 270 nm.

A determinação foi efectuada de acordo com o Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo IX.



**Figura 6** - espectrofotómetro UV/VIS Spectrometer Lambda 40 da marca Perkin Elmer utilizado para a medição da absorvância.

#### **3.1.1.4. Estabilidade oxidativa**

A estabilidade oxidativa de um azeite permite-nos ter uma ideia do seu período de vida. Existem diversos métodos que permitem fazer esta avaliação, entre os quais os testes de condutividade, tendo sido utilizado neste trabalho o Rancimat. Estes testes baseiam-se na decomposição dos hidroperóxidos com formação de ácidos de cadeia curta que alteram a condutividade da água. Os ácidos, que se produzem em maior

quantidade quando o azeite é aquecido a temperaturas iguais ou superiores a 100 °C são o ácido acético e o ácido fórmico (Baer, 2006).

Segundo Gouveia (1995) o fim do período de indução é indicado pelo começo do aumento exponencial da condutividade, devido à dissolução, na água, dos ácidos carboxílicos, formados durante o processo de oxidação. Os resultados expressos em horas referem-se ao momento em que a curva de condutividade inflecte e que coincide com o termo do período de indução. Este período mede-se pelo tempo decorrido entre o momento em que a amostra atingiu a temperatura desejada e o momento em que os produtos de oxidação se começam a desenvolver exponencialmente. Corresponde ao momento em que se verifica maior absorção de oxigénio e deterioração do “flavour”.

Para proceder à determinação colocou-se 4 g de azeite com a ajuda de uma pipeta, num tubo posteriormente fechado com uma ligação para a passagem de oxigénio, e colocou-se a 110°C em banho termostaticamente controlado, no aparelho Rancimat da Metrohm (fabricado na Suíça). O oxigénio do ar, purificado, passa, com um fluxo de 20 L/h, através da amostra e vai reagindo lentamente com o azeite, que se vai oxidando ao longo do tempo.

Os produtos voláteis da decomposição, principalmente os ácidos fórmico e acético, libertados durante a oxidação, e o ar passam para um frasco que contém água pura desionizada e na qual está mergulhado um eléctrodo, para medição da condutividade eléctrica. O eléctrodo está ligado a um sistema de medição e registo gráfico que nos indica o tempo total decorrido até à degradação total do azeite.



**Figura 7 - Aparelho Rancimat da Metrohm**



### 3.1.1.5 Polifenóis totais

Os polifenóis são considerados os principais compostos com actividade antioxidante presentes no azeite, dada a sua capacidade de doar um átomo de hidrogénio ao radical lipídico formado durante a sua fase de propagação da oxidação dos lípidos, contribuindo, assim, para a estabilidade do azeite. (Ribeiro, 2005).

A determinação dos polifenóis totais foi feita por espectrofotometria, através de um espectrofotómetro UV/VIS Spectrometer Lambda 40 da marca Perkin Elmer.

Pesou-se, rigorosamente 10,000 g da amostra de azeite e dissolveu-se em 25 ml de n-hexano. De seguida transferiu-se a mistura (azeite/n-hexano) para uma ampola de decantação de 100 ml e fez-se três extracções consecutivas, utilizando-se para cada uma delas 10 ml de uma mistura de metanol/água (6:4 V/V). Recolheu-se os três extractos fenólicos num balão de 50 ml, e completou-se o seu volume com água destilada.

Posteriormente, com o auxílio de pipetas, num balão volumétrico de 25 ml colocou-se 14 ml de água destilada, 5 ml do extracto fenólico e 1,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se energeticamente e colocou-se, de seguida, no escuro durante três minutos.

Ao fim desse tempo, adicionou-se ao balão 4 ml de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%, previamente preparada, completando-se o restante volume com água destilada. Agitou-se a mistura e colocou-se novamente no escuro durante 1 hora.

Após esse tempo, transferiu-se parte do conteúdo do balão de 25 ml para frascos, de forma a efectuar-se a centrifugação da solução, eliminando-se deste modo, partículas em suspensão que muitas vezes são responsáveis por interferências indesejáveis. A solução centrifugada foi colocada numa célula espectrofotométrica, procedendo-se à respectiva leitura no espectrofotómetro.

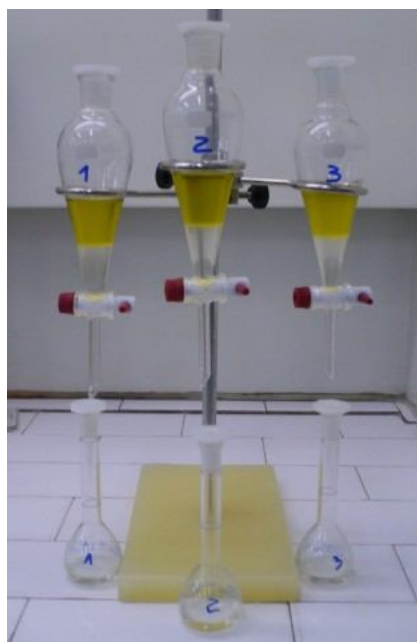
O aparelho foi inicialmente calibrado com soluções de referência. A preparação da solução referência foi feita da seguinte maneira: mediu-se, para um balão de 25 ml, 14 ml de água destilada, 2,50 ml da mistura metanol/água (6/4) e 1,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se e guardou-se no escuro durante três minutos. Ao fim desse

tempo adicionou-se 4 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (a 20%) e completou-se com água destilada e guardou-se 1 hora no escuro. Transferiu-se para um frasco para a centrifugação e coloca-se o sobrenadante numa célula espectrofotométrica, procedendo-se à respectiva leitura no espectrofotómetro.

Os resultados são expressos pela seguinte fórmula:

$$\text{Total de Polifenóis} = \frac{(8,53993721 \times \text{leitura} - 0,24765388) \times 10 \times 25}{\text{Peso da Amostra}}$$

O resultado vem expresso em mg/kg com uma casa decimal.



**Figura 8** – Extracção dos polifenóis numa ampola de decantação

A análise foi efectuada de acordo com o procedimento interno do LET nº IT065.

### **3.1.1.6 Tocoferóis**

O método baseia-se na determinação dos tocoferóis naturais livres através de HPLC com um detector UV. Utilizou-se um sistema HPLC Perkin Elmer constituído por uma bomba, um injectador (com um loop de 10  $\mu\text{l}$ ) e um detector (Perkin Elmer UV / VIS LC

295 a 292 nm). A coluna LichroCART de marca Merck (Alemanha) encontra-se no forno que mantém a temperatura constante de 24°C. O fluxo é de 2 ml/min.

Foi utilizada uma solução composta por 4% A + 96% B sendo:

A = 0,25 ml de  $H_3PO_4$  + 50 ml de água destilada

B = 500 ml de acetonitrilo (para HPLC) + 500 ml de metanol (para HPLC)

- Preparação da solução padrão de tocoferol  $\alpha$ :

Pesou-se, rigorosamente, 20 mg de padrão (padrão tocoferol  $\alpha$  Fluka, ref<sup>a</sup>89550) num balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com acetona. Pipetou-se 10 ml da solução padrão para um balão e evaporou-se a temperatura não superior a 30°C. Logo que o solvente esteja evaporado, pipetou-se para o balão 10 ml de metanol (para HPLC) dissolvendo assim o tocoferol. Mediu-se a absorvência da solução a 292 nm e calculou-se a sua concentração, dividindo a leitura da absorvência por 0,0076. Obtendo-se um valor de 0,32 ou 0,33 procede-se à preparação da solução de trabalho (caso não seja este o valor obtido, prepara-se uma nova solução de padrão stock).

- Preparação da solução padrão de trabalho de tocoferol  $\alpha$ :

Pipetou-se 2 ml da solução padrão para um balão volumétrico de 25 ml e completa-se com acetona (HPLC) e guardou-se no escuro entre 0-5 °C.

- Preparação da amostra:

Pesou-se rigorosamente 1,000 g de azeite para um balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com acetona para HPLC.

- Determinação do teor de tocoferol na amostra:

Condicionou-se a coluna no início do dia, uma hora antes de proceder à determinação. Injectou-se 30  $\mu$ l da solução padrão de trabalho de tocoferol  $\alpha$  no sistema HPLC e registou-se a área do tocoferol. De seguida injectou-se 30  $\mu$ l da amostra e identificou-se os tocoferóis presentes.

O teor do tocoferol foi calculado usando a seguinte formula:

$$Tocoferol = \frac{As \times Cstd \times 1000}{Astd \times P}$$

As – área da amostra

Astd – média das duas áreas do padrão tocoferol  $\alpha$

Cstd – concentração da solução padrão de trabalho (0,32 ou 0,33)

P – peso da amostra em gramas

O teor de tocoferóis é expresso em mg/kg.

O método utilizado para a determinação de tocoferóis foi o procedimento interno do LET nº IT064.



**Figura 9** – Aparelho HPLC Perkin Elmer utilizado na determinação dos tocoferóis

### 3.1.1.7 Triacilgliceróis oxidados

A identificação e quantificação evolutiva da oxidação dos triglicéridos tem sido desenvolvida nos últimos anos usando o método HPLC. Um método utilizado neste trabalho foi estabelecido em 2005 pela Comissão Técnica da Estação Experimental de Óleos e Gorduras (SSOG – Stazione Sperimentale Oli e Grassi) em Itália. Esta norma descreve um procedimento para a determinação quantitativa dos principais ácidos gordos oxidados presentes nos triacilgliceróis do azeite virgem.

**Quadro 3** - Graus de oxidação detectados em azeites

<b>Azeite virgem</b>	<b>Total de ácidos gordos oxidados (%)</b>
Amostra fresca	< 2%
Armazenado até 18 meses	> 2% e < 4%
Expirado	> 4%

Fonte: Rovellini e Cortesi, 2004

Os ácidos gordos oxidados presentes na forma primária (hidroperóxidos) e secundária (hidroácidos e cetonas) nos triacilgliceróis do azeite virgem são transterificados com benzilato de sódio, extraídos e quantificados como derivados do ester benzílico, através de HPLC que se encontra equipado com um detector de UV, no comprimento de onda de 255 nm, bomba e forno (a funcionar a 23°C) da PerkinElmer. Foi utilizada uma coluna phenomenex sherelone 5u ODS (2) tamanho 250x4,60mm com uma pré-coluna instalada para filtração das impurezas.

Pesou-se rigorosamente 0,500 g de azeite para um balão de 25 ml e completou-se o volume com n-hexano. Transferiu-se com 1 ml da solução para um tubo de ensaio cónico de 10 ml e adicionou-se 1 ml da solução padrão (I.S.1 + I.S.2). Adicionou-se de seguida 50 µl de benzilato de sódio em álcool benzílico 1,0 M usando uma seringa de 500 µl, devido à viscosidade do reagente, e agitou-se no vortex durante cerca de um minuto. Colocou-se a amostra em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente. Durante este tempo ocorreu a reacção de transesterificação, cujo desenvolvimento é visível através da formação de uma solução turva. Ao fim deste tempo adicionou-se 10 µl de ácido acético glacial para bloquear a reacção. Agitou-se no vortex durante alguns segundos e de seguida centrifugou-se a solução a 3000 rpm durante 10 minutos. Transferiu-se de imediato o sobrenadante para um eppendorf e evaporou-se em corrente de azoto num banho a 40°C. Adicionou-se 1 ml de isopropanol.

Condicionou-se a coluna no início do dia, uma hora antes de proceder à determinação. Injectou-se 20 µl de isopropanol para garantir a não interferência de picos estranhos. Antes de injectar a amostra injectou-se 20 µl da solução padrão transterificada no sistema HPLC e registou-se a área do padrão. De seguida injectou-se 20 µl da amostra e identificou-se os tocoferóis presentes.

O sistema binário do solvente, no qual correm as amostras, possui um fluxo de 1 ml/min e é constituído da seguinte maneira:

T= 0 min: água/acetonitrilo 40/60 V/V

T= 50 min: água/acetonitrilo 0/100 V/V

T= 70 min: água/acetonitrilo 0/100 V/V

T= 71 min: água/acetonitrilo 40/60 V/V

T= 85 min: água/acetonitrilo 40/60 V/V

A solução do padrão interno é feita da seguinte forma: pesou-se 0,010 g ( $\pm 0,001$ ) de tricaproína (I.S.1) e 0,020 g ( $\pm 0,001$ ) de triheptadecanoína (I.S.2) para um balão de 50 ml e completou-se o volume com hexano.

É feito um controlo da reacção para avaliar se a reacção de transesterificação se deu correctamente calculando a razão RRF entre os factores de resposta do benzilcaproato RF (I.S.1) e o benzilheptadecanoato RF (I.S.2) através da seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Benzilcaproato injectado } (\mu\text{l}) \\ &= \frac{\text{tricaproína } (\mu\text{l/ml}) \times 3 \times \text{benzilcaproato} \times 20 \mu\text{l injectados}}{\text{PM tricaproína} \times 1000 \mu\text{l/ml}} \\ &= \frac{200 \times 3 \times 206 \times 20}{386 \times 1000} = 6,40\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Benzilheptadecanoato injectado } (\mu\text{l}) = \\ &= \frac{\text{trieptadecanoína } (\mu\text{l/ml}) \times 3 \times \text{Benzilheptadecanoato} \times 20 \mu\text{l injectados}}{\text{PM trieptadecanoína} \times 1000\mu\text{l/ml}} \\ &= \frac{400 \times 3 \times 360 \times 20}{849 \times 1000} = 10,17\mu\text{l} \end{aligned}$$

PM – peso molecular

$$RF_{1\mu\text{l}}(I. S. 1) = \frac{\text{área benilcaproína}}{\text{benilcaproato injectado } \mu\text{g}} = \frac{\text{área}}{6,40} \mu\text{g}$$

$$RF_{1\mu l}(I.S. 2) = \frac{\text{área benzilheptadecanoína}}{\text{benzilheptadecanoato injectado } \mu g} = \frac{\text{área}}{10,17 \mu g}$$

$$RRF = \frac{RF_{1\mu l}(I.S. 1)}{RF_{1\mu l}(I.S. 2)}$$

A constância deste valor, para a amostra padrão e para as amostras, é um índice de um bom controlo da reacção.

O conteúdo em ácidos gordos oxidados é avaliado pela percentagem em peso (mg/100mg) de ácidos gordos oxidados utilizando o factor resposta do benzilheptadecanoato ( $RF_{1\mu g}$  I.S.2). A percentagem do total de ácidos gordos oxidados é calculada medindo a soma de todas as áreas dos picos cromatográficos correspondentes às diversas formas dos compostos resultantes da oxidação dos ácidos gordos linolénico, linoleico e oleico, através da seguinte fórmula:

$$\%AGO(mg/100mg) = \frac{(\sum A) \times 100}{RF_{1\mu l}(I.S. 2) \times P \times 20}$$

% AGO (mg/100mg) – percentagem de ácidos gordos oxidados, em mg por 100 mg de azeite virgem

$\sum A$  – soma de todas as áreas dos picos correspondentes aos ácidos gordos oxidados

P – peso da amostra de azeite virem em mg/ml

20 – volume de amostra injectado no sistema HPLC

A análise foi efectuada de acordo com o procedimento interno do LET nº IT071.

### 3.1.2. Controlo laboratorial sensorial

A análise sensorial é uma medida científica usada para analisar e interpretar as reacções humanas perante certas características dos alimentos que são percebidas pelos sentidos. É um exame das características de um produto mediante os órgãos dos sentidos. O painel de provas é constituído por um grupo de provadores sob

condições controladas. O seu fim é substituir um juízo individual por um critério médio de um grupo de provadores seleccionados e treinados (Granados, 2000).

Uma vez que a cor de um azeite não caracteriza a sua qualidade, os provadores profissionais utilizam copos de vidro de cor azul, para não se deixarem influenciar pela sua tonalidade.

O azeite é aquecido a uma temperatura de, aproximadamente, 28°C de modo a que os componentes voláteis que conferem o cheiro e o sabor ao azeite se libertem mais facilmente. Assim, pode-se encontrar nos azeites dois tipos de atributos, a que correspondem sensações distintas:

- Atributos positivos, que qualificam os azeites virgens
- Atributos negativos ou defeitos, indicadores de má qualidade.

Colocou-se cerca de 12 g de azeite a provar, num copo escuro, com um vidro de relógio por cima e com um código de identificação da amostra. As amostras nos copos foram colocadas numa iogurteira modificada (termostizada) regulada para 28 °C.

O método utilizado consta no regulamento (CE) nº 2568/91, anexo XII.

### **3.1.3. Análise estatística de resultados**

O tratamento estatístico foi realizado através do programa Statistica. Para analisar diferenças entre as médias recorreu-se à análise de variância (ANOVA).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Controlo laboratorial químico

No início do estudo efectuou-se uma análise do azeite a utilizar nos depósitos, obtendo-se os valores apresentados no quadro 4.

**Quadro 4** – Caracterização do azeite utilizado, antes de ser colocado em depósitos.

Grau de acidez (%)	Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)	Absorvância			Rancimat (horas)	Polifenóis (mg/kg)	Tocoferóis (mg/kg)	Triacilgliceróis oxidados (%)
		K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	ΔK				
0,150	6,294	1,643	0,099	-0,004	18	181,900	194,440	1,300

Nos quadros 5 e 6 apresenta-se os valores de ácidos gordos totais (%) e esteróis (%), eritrodil+uvaol (%) e ceras (mg/kg), obtidos das análises iniciais de caracterização do azeite utilizado no estudo.

**Quadro 5** – Ácidos gordos do azeite de variedade arbequina utilizado no ensaio

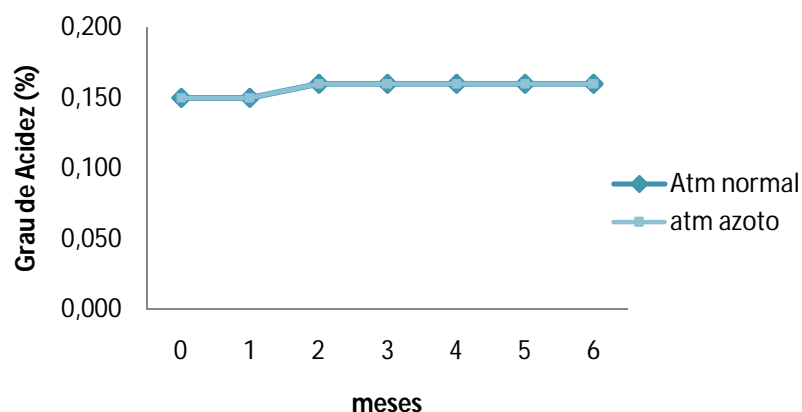
Ácidos gordos		Limites (%)
Mirístico	C 14:0	0,02
Palmítico	C 16:0	15,5
Palmitoleico	C 16:1	1,8
Margárico	C 17:0	0,1
Margaroleico	C 17:1	0,2
Esteárico	C 18:0	1,8
Oleico	C 18:1	69,9
Linoleico	C 18:2	9,4
Linolénico	C 18:3	0,6
Araquídico	C 20:0	0,3
Gadoleico	C 20:1	0,2
Beénico	C 22:0	0,1
Lignocérico	C 24:0	0,004

**Quadro 6** – Valor dos esteróis, eritrodiol + uvaol e ceras do azeite arbequina

<b>Esteróis</b>	<b>(%)</b>
colesterol	0,1
campesterol	3,3
stigmasterol	0,8
$\beta$ -sitosterol	94,9
$\Delta$ -7-stigmastenol	0,1
eritrodiol+uvaol	2,30
esteróis totais	1477 mg/kg
<b>Ceras (mg/kg)</b>	143

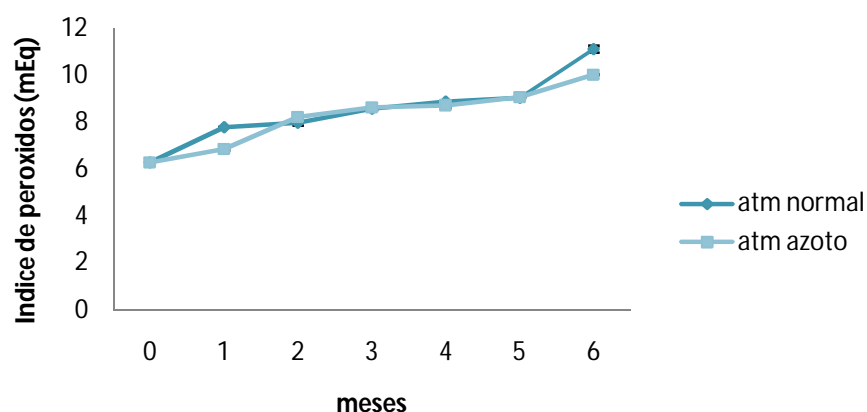
Os valores das análises, dos diferentes depósitos, obtidos ao longo dos seis meses encontram-se tabelados em anexo. Para cada uma das análises efectuou-se um gráfico comparativo dos diferentes depósitos.

O grau de acidez do azeite (figura 10) manteve-se relativamente constante em ambos os tipos de depósitos, dado que os valores obtidos ao longo do tempo foram sempre os mesmos (fazendo com que as rectas dos gráficos coincidam). Ocorreu apenas um ligeiro aumento a partir do segundo mês, passando a acidez de 0,150 para 0,160%. A acidez mede a percentagem de ácidos gordos que estão livres da estrutura dos triacilgliceróis. É importante saber este valor dado que no processo de auto-oxidação, os ácidos gordos livres oxidam-se mais facilmente do que estando esterificados no glicerol.



**Figura 10** - Grau de acidez das amostras recolhidas ao longo de seis meses

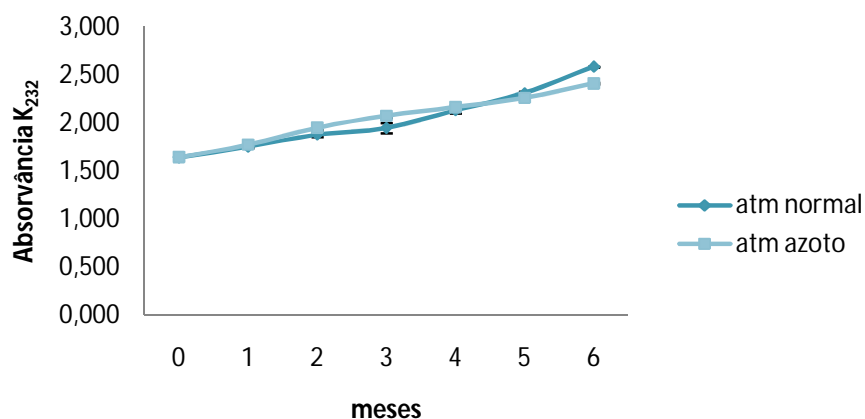
Comparando o índice de peróxidos (figura 11), que nos indica a medida dos produtos secundários da oxidação, verifica-se que o azeite dos depósitos com atmosfera normal aumentou mais (11,113 mEq O<sub>2</sub>/kg) que o azeite nos depósitos com inertização (10,037 mEq O<sub>2</sub>/kg) no final dos seis meses. Ao fim do primeiro mês o azeite contido nos depósitos com atmosfera normal aumentou mais rapidamente para 7,783 mEq O<sub>2</sub>/kg mas a partir do segundo mês os diferentes depósitos tiveram valores semelhantes, mas os valores do azeite armazenado em atmosfera normal foram sempre superiores aos do azeite armazenado em depósitos inertizados.



**Figura 11** – Índice de peróxidos das amostras recolhidas ao longo de seis meses

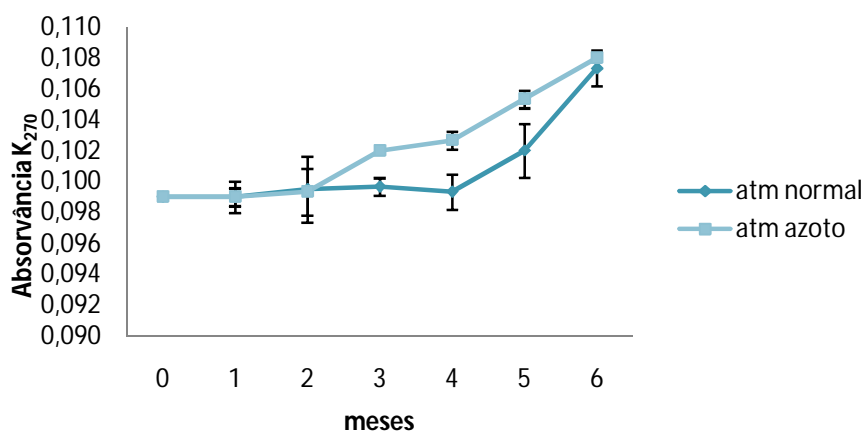
Dado que os hidroperóxidos são os primeiros produtos resultantes da oxidação do azeite, como já foi referido anteriormente, pode-se constatar que os depósitos cuja atmosfera não foi modificada sofreram um maior grau de oxidação comparativamente aos depósitos cujo espaço de cabeça estava preenchido com gás inerte.

Analisando os valores obtidos para a análise espectrofotométrica a 232 nm (figura 12) verificou-se grande semelhança entre eles. No final do último mês, os depósitos com atmosfera normal apresentaram um valor ligeiramente superior (2,583) relativamente aos depósitos com atmosfera de gás inerte (2,410).



**Figura 12** – Absorvância  $K_{232}$  das amostras recolhidas ao longo de seis meses

Ao observar o gráfico obtido para a absorvância a 270 nm (figura 13) verificou-se que os depósitos cujo espaço de cabeça continha azoto apresentaram um valor ligeiramente superior (0,108) aos dos depósitos cuja atmosfera continha oxigénio (0,107), mas a diferença não é significativa.

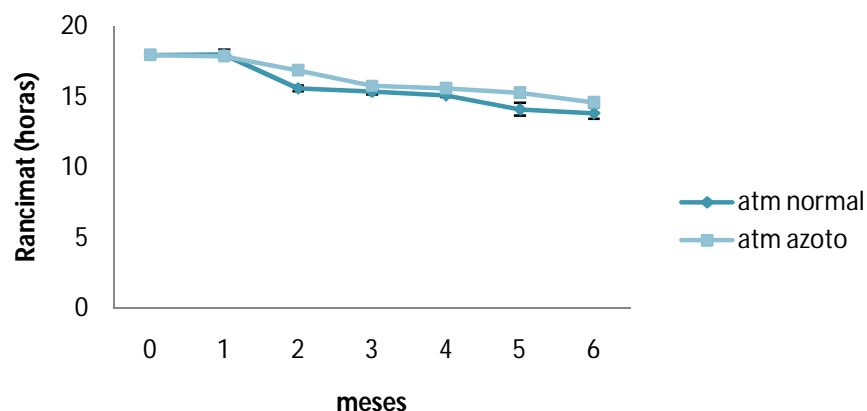


**Figura 13** – Absorvância  $K_{270}$  das amostras recolhidas ao longo de seis meses

O azeite armazenado em depósitos com atmosfera normal apresentou um maior valor de radicais livres, cuja absorção é máxima a 232 nm. Verificou-se que os produtos secundários da oxidação do azeite (compostos carbonílicos), cuja absorção é máxima a 270 nm apresentaram maior presença no azeite armazenado nos depósitos com azoto.

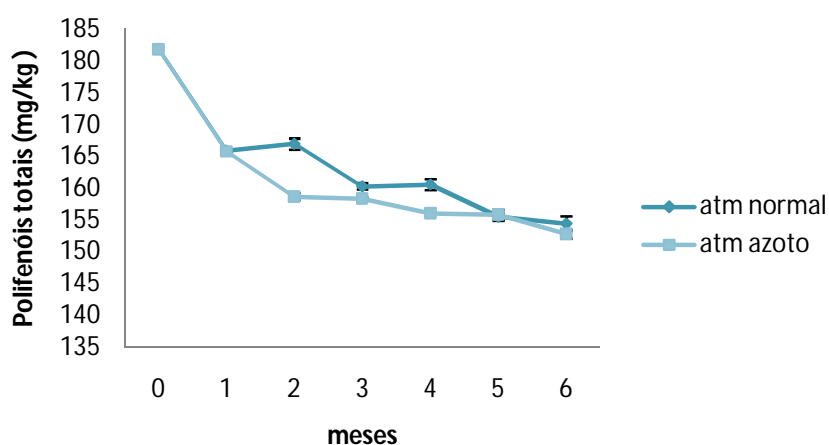
## A INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE GÁS INERTE NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS AZEITES VIRGENS NOS DEPOSITOS DE ARMAZENAMENTO

A estabilidade oxidativa (indicadora do período de vida do azeite) e ambos os tipos de depósitos (figura 14) foi diminuindo ao longo dos seis meses. No azeite contido nos depósitos com atmosfera normal a sua estabilidade diminui mais rapidamente que no azeite contido nos depósitos com gás inerte. Ao fim de seis meses, os primeiros apresentaram um valor de 13h 52 min e os segundos de 14h 38 min.



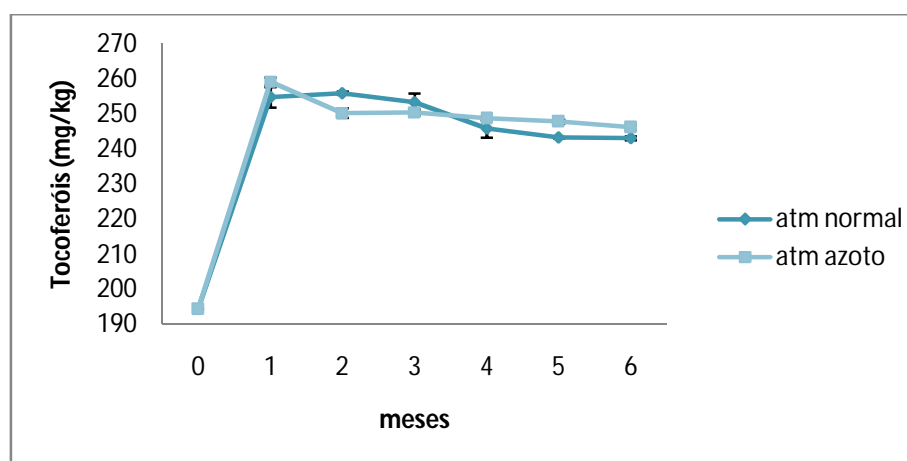
**Figura 14** – Estabilidade oxidativa das amostras recolhidas ao longo de seis meses

Os polifenóis totais, antioxidantes naturais, (figura 15) de ambos os tipos de amostra foram diminuindo ao longo dos seis meses, destacando-se o facto de o azeite contido nos depósitos com atmosfera normal apresenta valores superiores (154,413 mg/kg) ao do azeite contido nos depósitos com azoto (152,793 mg/kg).



**Figura 15** – Polifenóis totais das amostras recolhidas ao longo de seis meses

Os tocoferóis, tal como os polifenóis, contribuem de forma importante para a estabilidade do azeite e tem um papel biológico benéfico como antioxidante. Dado que são fáceis de oxidar, os tocoferóis são excelentes agentes antioxidantes naturais e conferem estabilidade. Relativamente à sua presença nas amostras (figura 16) observou-se que o valor inicial da amostra de azeite foi de 194,440 mg/kg e que no primeiro mês de recolha das amostras aumentou para 254,820 mg/kg nos depósitos com atmosfera normal e 259,280 mg/kg nos depósitos inertizados com azoto. Este aumento poder-se-a dever a uma das duas situações: dado que os tocoferóis facilmente se degradam com a luz poderá ter ocorrido uma perda na amostra inicial, dado que esta não foi analisada imediatamente após a recolha da mesma, devido a uma indisponibilidade do aparelho de HPLC; poderá também ter ocorrido síntese de tocoferóis nos depósitos, caso este já verificado em outros estudos.

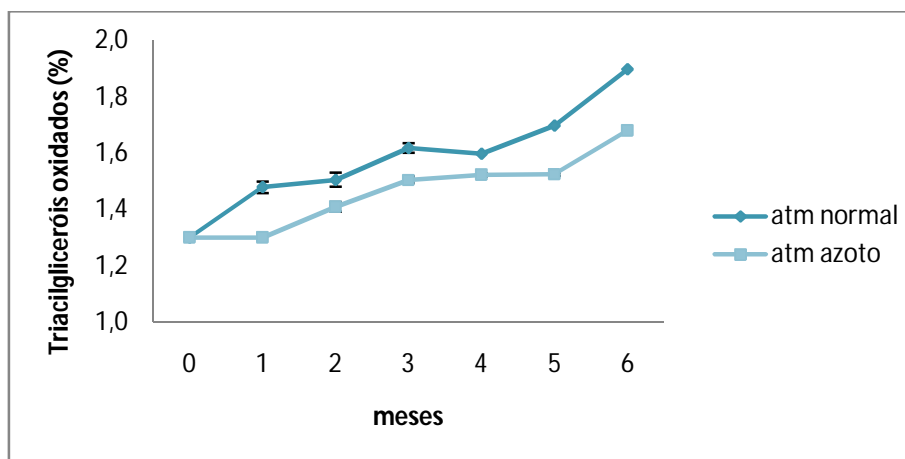


**Figura 16** – Tocoferóis das amostras recolhidas ao longo de seis meses

Não foi apresentado nenhum tipo de tratamento estatístico aos dados até aqui obtidos dado que as diferenças entre os valores eram muito pequenas, o que também se pode verificar pelas barras de erro do desvio padrão.

**Nota:** O erro padrão é igual ou inferior à dimensão do símbolo quando este não é visível.

Os valores obtidos na análise dos triacilgliceróis oxidados (figura 17) demonstraram que o azeite armazenado em depósitos cuja atmosfera não foi alterada apresentaram uma maior percentagem de ácidos gordos oxidados relativamente aos depósitos com gás inerte. Estes últimos mantiveram valores mais estáveis entre os meses três e cinco, aumentando ligeiramente no último mês para 1,68%. O azeite dos depósitos com atmosfera normal foi aumentando gradualmente o seu valor de triacilgliceróis oxidados atingindo o valor de 1,9%.



**Figura 17** – Triacilgliceróis oxidados das amostras recolhidas ao longo de seis meses

Realizou-se o teste de Scheffe, no programa estatístico ANOVA, e obteve-se o quadro 7, onde se pode verificar diferenças significativas entre os 2 tipos de depósitos ao longo dos 6 meses de estudo. Pode-se observar, que ao fim de dois meses não se verificam alterações significativas nos depósitos de atmosfera normal. A diferença entre os meses 3 e 4 destes depósitos também não é significativa. Relativamente aos depósitos com atmosfera modificada pode-se verificar que as alterações não foram significativas entre o mês 3 até ao mês 5. Comparando os dois tipos de atmosfera ao longo dos seis meses constatou-se que nos 6 meses do estudo a diferença de resultados é significativa. Ao fim de 3 meses os depósitos com atmosfera modificada apresentam resultado semelhante ao dos depósitos com atmosfera não modificada ao fim de dois meses, o que se pode também observar pelo valor da média dos resultados obtidos. Os depósitos com azoto na atmosfera apresentam valores semelhantes nos últimos meses, aos depósitos com atmosfera normal nos últimos meses.

**A INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE GÁS INERTE NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS AZEITES VIRGENS  
NOS DEPOSITOS DE ARMAZENAMENTO**

**Quadro 7 – Triacilgliceróis oxidados avaliados pelo Teste de Scheffe.**

grupo	n1	n2	n3	n4	n5	n6	a1	a2	a3	a4	a5	a6
média	1,480	1,507	1,620	1,600	1,700	1,900	1,300	1,410	1,507	1,523	1,527	1,680
n1		0,782	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,782	0,140	0,084	0,000
n2	0,782		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,990	0,961	0,000
n3	0,000	0,000		0,961	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008
n4	0,000	0,000	0,961		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
n5	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,961
n6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
a1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
a2	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
a3	0,782	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,990	0,961	0,000
a4	0,140	0,990	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,990		1,000	0,000
a5	0,084	0,961	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,961	1,000		0,000
a6	0,000	0,000	0,008	0,000	0,961	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

n1 a n6 – depósitos com atmosfera normal, do mês 1 ao mês 6

a1 a a6 – depósitos com atmosfera modificada com azoto, do mês 1 ao mês 6



## 4.2. Controlo laboratorial sensorial

Foi feito uma avaliação comparativa das amostras dos depósitos de atmosfera normal com os depósitos cuja atmosfera é inerte. Cada atributo foi avaliado, numa escala de intensidade de 0 a 5, e a apreciação global da amostra foi classificada de 1 a 9. No quadro 8 encontra-se as médias dos valores atribuídos às amostras.

**Quadro 8** – Média dos valores obtidos através de análise sensorial das amostras

		Frutado	Fruto maduro: tomate verde	Verde	Amargo	Picante	Doce	Valorização global
<b>Depósitos com atmosfera normal</b>	mês 1	2,5	2	1	1	1,5	1,5	7,5
	mês 2	2,5	2	1	1,5	1,5	1,5	7,5
	mês 3	2	1	1	1,5	1,5	1,5	7,2
	mês 4	2	2	0,5	1	1,5	1,5	7,2
	mês 5	2	2	0	1	1,5	1,5	7,2
	mês 6	2	1,5	0	0,5	0,5	1,5	7
<b>Depósitos com atmosfera inerte</b>	mês 1	2,5	2	1	1	1,5	1,5	7,5
	mês 2	3	2	1,5	1,5	1,5	1,5	7,5
	mês 3	3	2	1	1,5	2	1,5	7,5
	mês 4	3	2	0,5	1	2	2	7,4
	mês 5	3	2	1	1	2	2	7,4
	mês 6	3	2	1	1	1,5	2	7,4

Utilizando o programa Statistica, realizou-se uma análise ANOVA, com uma significância  $\leq 0,05$ , para os resultados obtidos na análise sensorial. Nos quadros seguintes apresenta-se os resultados obtidos.

Relativamente ao atributo “frutado” pode-se verificar que existe uma diferença significativa entre os valores, apresentando-se as amostras dos depósitos com atmosfera inerte uma maior intensidade do atributo “frutado”. Realizou-se também um teste de Scheffe para verificar os resultados e como se pode comprovar ao observar o quadro 10, obteve-se o mesmo resultado apresentado no quadro 9.

**Quadro 9** – Avaliação do atributo “frutado” através do teste LSD

	{1}	{2}
	2,1667	2,9167
Atmosfera normal {1}		0,0002
Atmosfera com azoto {2}	0,0002	

**Quadro 10** - Avaliação do aroma “frutado” através do teste de Scheffe

	{1}	{2}
	2,1667	2,9167
Atmosfera normal {1}		0,0002
Atmosfera com azoto {2}	0,0002	

Relativamente ao atributo “verde”, como se pode observar no quadro 11, não se obteve diferença significativa.

**Quadro 11** - Avaliação do atributo “verde” através do teste LSD

	{1}	{2}
	0,5833	1,0000
Atmosfera normal {1}		0,1114
Atmosfera com azoto {2}	0,1113	

O mesmo se pode observar para o atributo “amargo”, representado no quadro 12.

**Quadro 12** - Avaliação do atributo “amargo” através do teste LSD

	{1}	{2}
	1,0833	1,1667
Atmosfera normal {1}		0,6643
Atmosfera com azoto {2}	0,6642	

Ao observar o quadro 13 pode-se observar que relativamente ao atributo “picante” obteve-se um valor muito próximo de 0,05. Poder-se-ia ter um resultado mais concreto se tivesse havido um maior número de provas.

**Quadro 13** - Avaliação do atributo “picante” através do teste LSD

	{1}	{2}
	1,3333	1,7500
Atmosfera normal {1}		0,0646
Atmosfera com azoto {2}	0,0646	

No atributo “doce” também se obteve diferenças significativas, como se pode verificar no quadro 14, tendo as amostras dos depósitos com atmosfera inerte apresentado uma maior intensidade.

**Quadro 14** - Avaliação do atributo “doce” através do teste LSD

	{1}	{2}
	1,5000	1,7500
Atmosfera normal {1}		0,0493
Atmosfera com azoto {2}	0,0493	

Na avaliação global das diferentes amostras, representado no quadro 15, também se obteve uma diferença significativa entre elas, apresentando os azeites dos depósitos com atmosfera normal, alterações mais elevadas do que os azeites dos depósitos com atmosfera inerte.

**Quadro 15** - Avaliação do valor global atribuído às amostras, através do teste LSD

	{1}	{2}
	7,2667	7,4500
Atmosfera normal {1}		0,0524
Atmosfera com azoto {2}	0,0524	

## 5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos através da análise química dos azeites nos diferentes depósitos, permitem concluir que se observa uma maior oxidação nos depósitos cuja atmosfera não foi alterada, apesar de não se verificarem diferenças significativas entre eles à exceção dos triacilgliceróis oxidados que apesar da diferença de valores não ser muito alta, é significativa.

Relativamente aos resultados observados na análise sensorial verifica-se que os depósitos com atmosfera inerte apresentam uma maior intensidade nos atributos “frutado”, “picante” e “doce”. Em relação à avaliação global os mesmos depósitos apresentam uma melhor classificação em comparação com os depósitos com atmosfera normal.

Assim, embora o período em que se realizou o estudo tenha sido, manifestamente curto, os resultados parecem indicar algumas vantagens, sob o ponto de vista qualitativo dos azeites virgens, da utilização de gás inerte no espaço de cabeça dos depósitos de armazenamento.

Para se poderem ter resultados mais conclusões os ensaios deveriam ser prolongados no tempo, o que não sucedeu por limitações de prazos de execução e entrega impostos a trabalhos desta índole.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aparício, R.; Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Aparício, R.; Harwood, J. (2000). *Handbook of olive oil: analysis and properties*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Aparício, R.; Roda, L.; Albi, M.A.; Gutiérrez, F. (1999). *Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by ramcimat*. J. Agric. Food Chem, 47, 4150-4155.

Aued-Pimentel, S.; Takemoto E.; Kumagai E.E.; Cano C.B. (2008). *Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicérido ECN 42 para a detecção da adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil*. Quim. Nova, Vol. 31, No. 1, 31-34.

Baer, I.M.P.C. (2006). *Contribuição para o estudo da degradação oxidativa de azeites virgens provenientes das cultivares cordovil de serpa, galega vulgar e verdeal alentejana*. Tese para a obtenção do grau de Mestrado em Olivicultura, Azeite e Azeitona de mesa. U.T.L., I.S.A, Lisboa.

Boskou, D. (1998). *Química y tecnología del aceite de oliva*. AMV Ediciones, Mundi-Prensa. Madrid.

Campos, L. (2002). *Entender a bioquímica*. Escolar Editora. Lisboa.

Campos, L.; Mourato, M. (2002). *Nomenclatura dos compostos orgânicos*. Escolar Editora. Lisboa.

Carrilho, A.P.B.S. (2003). *Definição do período óptimo de colheita das azeitonas e caracterização dos azeites das cultivares galega e cobrançosa da DOP "Azeites do Norte Alentejano"*. Relatório de Trabalho de Fim de Curso em Engenharia Agro-Industrial. U.T.L., I.S.A, Lisboa.

Fernández, M.H.; Ojeda, M.; Rodríguez, A.; Bernardino, J.; Ruiz, L.; García, A. (1991). *Elaboracion de aceite de oliva de calidad*. Junta de Andalucia, Direccion General de Investigacion, Tecnología e Formation Agroalimentaria y Pesquera, 5/91 Apuntes. Sevilha.

Giovacchino, L.D. (2007). *Stockage, conditionnement et étiquetage de l'huile d'olive* (PP), Tunisia.

Gouveia, J.M.N.B. (1995). *Azeites virgens do Alto Alentejo – Comportamentos quimico, tecnologico e sensorial*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. U.T.L., I.S.A., Lisboa.

Gouveia, J.M.N.B. (2002). *Historia da Cultura Olivícola e Oleícola em Portugal. O Azeite em Portugal*, Edições Inapa.

Granados, J.A. (2000). *Enciclopédia del aceite de oliva*. Editorial Planeta S. A., Barcelona.

Guedes, R.M.C. (2000). *A Influencia de Alguns Factores nos Antioxidantes dos Azeites Virgens*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. U.T.L., I.S.A., Lisboa.

Gutiérrez, A. B.; Pancorbo, A. C.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Carretero, A. S.; Toschi, T. G. (2005). *Analytical determination of polyphenols in olive oils*. J. Sep. Sci., 28, 837-858.

Karim, M.D.S. (1998). *Análise de antioxidantes em azeite de Sardenha*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em ciência e tecnologia de alimentos, U.T.L., Lisboa.

Monteiro, M. (1999). *A oliveira*. João Azevedo Editor. Mirandela.

Morelló, J. R.; Motilva, M. J.; Tovar, M. J.; Romero, M. P. (2004). *Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on phenolic fraction*. Food Chemistry 85, 357-364.

Neves, C. M. T. (2000). *Aromatização de azeite virgem com óleos essenciais*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. U.T.L., I.S.A., Lisboa.

Regulamento (CE) n.º 640/2008 do Conselho de 4 de Julho de 2008.

Regulamento (CE) nº 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004.

Regulamento (CE) nº 1638/1998 do Conselho de 20 de Julho de 1998.

Regulamento (CE) nº 2568/1991 do Conselho de 11 de Julho de 1991.

Ribeiro, L. (2005). *Caracterização química do aroma de azeites virgens com atributos positivos e negativos*. Tese de Doutoramento em Química, especialidade em Química Orgânica. UNL, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Rovellini, P.; Cortesi, N. (2004). *Oxidative status of extra virgin olive oils: HPLC Evaluation*. Ital. J. Food Sci. 3 (16): 333-342.

Servilli, M.; Montedoro, G. (2002). *Contribution of phenolic compounds to virgin olive Oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 602-613.

Vaz-Freire, L.; Gouveia, J.M.J.; Freitas, A.M.C. (2008). *Analytical characteristics of olive oils produced by two different extraction techniques, in the Portuguese olive variety 'Galega Vulgar'*. Grasas y aceites, 59 (3), Julio-Septiembre, 260-266.

Velasco, J.; Dobarganes, C. (2002). *Oxidative stability of virgen olive oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 : 661-676.

Villalta, L. (1999). *Obtención del aceite de oliva virgen* – 2ª Edicion, Editorial Agrícola Española, S.A.. Madrid.

Visioli, F; Poli, A.; Galli, C. (2002). *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil*. Medicinal Research Reviews, vol 22, nº1, 65-75.

## **CIBERGRAFIA**

[http://www.vea.es/688\\_spanish/la\\_arbequina\\_web.htm](http://www.vea.es/688_spanish/la_arbequina_web.htm), consultado em 21 de Janeiro de 2008

<http://www.airliquide.com>, consultado em 5 de Setembro de 2008

<http://www.linde.pt>, consultado em 5 de Setembro de 2008



## **ANEXOS**

### Anexo A - Valores obtidos dos depósitos com atmosfera normal

Análises	mês 0	mês 1	mês 2	mês 3	mês 4	mês 5	mês 6
Grau acidez (%)		0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
	0,150	0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
		0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
média	0,150	0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
desvio padrão		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
índice peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)		7,790	7,930	8,600	8,870	9,020	11,280
	6,294	7,790	8,140	8,650	8,940	9,080	11,060
		7,770	7,890	8,520	8,850	9,020	11,000
média	6,294	7,783	7,987	8,590	8,887	9,040	11,113
desvio padrão		0,012	0,134	0,066	0,047	0,035	0,147
Absorvância K <sub>232</sub>		1,753	1,903	1,995	2,160	2,320	2,590
	1,643	1,763	1,868	1,890	2,130	2,320	2,580
		1,745	1,863	1,958	2,100	2,290	2,580
média	1,643	1,754	1,878	1,948	2,130	2,310	2,583
desvio padrão		0,009	0,022	0,053	0,030	0,017	0,006
Absorvância K <sub>270</sub>		0,092	0,101	0,099	0,098	0,103	0,108
	0,099	0,093	0,098	0,100	0,100	0,103	0,108
		0,094	0,099	0,100	0,100	0,100	0,106
média	0,099	0,099	0,100	0,100	0,099	0,102	0,107
desvio padrão		0,001	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
Absorvância ΔK		-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
		-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
média	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
desvio padrão		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Rancimat (Horas)		17,700	15,400	15,200	15,000	13,600	13,400
	18,000	18,000	15,700	15,600	15,200	14,400	14,000
		18,400	15,800	15,400	15,200	14,400	14,200
média	18,000	18,033	15,633	15,400	15,133	14,133	13,867
desvio padrão		0,351	0,208	0,200	0,115	0,462	0,416
Polifenóis (mg/kg)		165,700	166,070	159,790	160,100	154,780	153,080
	181,900	166,100	167,050	160,330	160,110	155,850	155,080
		166,000	167,800	160,760	161,520	155,850	155,080
média	181,900	165,933	166,973	160,293	160,577	155,493	154,413
desvio padrão		0,208	0,868	0,486	0,817	0,618	1,155
Tocoferóis (α) (mg/kg)		258,070	255,600	250,800	242,830	243,110	243,520
	194,440	252,450	256,400	255,500	247,710	243,470	242,620
		253,940	256,000	254,000	247,380	243,350	243,260
média	194,440	254,820	256,000	253,433	245,973	243,310	243,133
desvio padrão		2,912	0,400	2,401	2,727	0,183	0,463
Triacilgliceróis oxidados (%)		1,500	1,530	1,630	1,600	1,700	1,900
	1,300	1,460	1,480	1,630	1,600	1,700	1,900
		1,480	1,510	1,600	1,600	1,700	1,900
média	1,300	1,480	1,507	1,620	1,600	1,700	1,900
desvio padrão		0,020	0,025	0,017	0,000	0,000	0,000

## Anexo B – Valores obtidos dos depósitos com atmosfera inerte

Análises	mês 0	mês 1	mês 2	mês 3	mês 4	mês 5	mês 6
Grau de acidez (%)		0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
	0,200	0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
		0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
média	0,150	0,150	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
desvio padrão		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Índice peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)		6,900	8,240	8,630	8,690	9,070	10,040
	6,294	6,900	8,200	8,610	8,810	9,080	10,030
		6,800	8,260	8,680	8,640	9,100	10,040
média	6,294	6,867	8,233	8,640	8,713	9,083	10,037
desvio padrão		0,058	0,031	0,036	0,087	0,015	0,006
absorvância K <sub>232</sub>		1,783	1,968	2,080	2,170	2,260	2,400
	1,643	1,775	1,948	2,090	2,180	2,260	2,420
		1,765	1,930	2,050	2,140	2,260	2,410
média	1,643	1,774	1,949	2,073	2,163	2,260	2,410
desvio padrão		0,009	0,019	0,021	0,021	0,000	0,010
K <sub>270</sub>		0,095	0,098	0,102	0,102	0,105	0,108
	0,099	0,096	0,099	0,102	0,103	0,106	0,108
		0,096	0,101	0,102	0,103	0,105	0,108
média	0,099	0,099	0,099	0,102	0,103	0,105	0,108
desvio padrão		0,001	0,002	0,000	0,001	0,001	0,000
ΔK		-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
média	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003
desvio padrão		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Rancimat (Horas)		17,850	16,800	15,800	15,500	15,200	14,500
	18,000	18,000	17,200	15,800	15,700	15,700	14,600
		17,850	16,700	15,800	15,700	15,100	14,800
média	18,000	17,900	16,900	15,800	15,633	15,333	14,633
desvio padrão		0,087	0,265	0,000	0,115	0,321	0,153
Polifenóis (mg/kg)		166,000	159,260	158,590	156,060	155,000	153,080
	181,900	165,400	158,620	158,160	156,060	156,000	152,010
		165,900	158,120	158,360	156,060	156,490	153,290
média	181,900	165,767	158,667	158,370	156,060	155,830	152,793
desvio padrão		0,321	0,571	0,215	0,000	0,759	0,686
Tocoferóis (α) (mg/kg)		260,640	248,680	250,100	249,000	248,520	246,000
	194,440	258,550	251,060	249,900	248,170	247,570	247,000
		258,650	251,150	251,500	249,060	247,560	245,600
média	194,440	259,280	250,297	250,500	248,743	247,883	246,200
desvio padrão		1,179	1,401	0,872	0,497	0,551	0,721
Triacilgliceróis		1,300	1,400	1,520	1,520	1,530	1,680
oxidados	1,300	1,300	1,430	1,500	1,520	1,520	1,680
(%)		1,300	1,400	1,500	1,530	1,530	1,680
média	1,300	1,300	1,410	1,507	1,523	1,527	1,680
desvio padrão		0,000	0,017	0,012	0,006	0,006	0,000